



La membrane basale du tissu adipeux : son remodelage au cours de l'obésité et sa relation avec l'insulino-résistance

Sophie Reggio

► To cite this version:

Sophie Reggio. La membrane basale du tissu adipeux : son remodelage au cours de l'obésité et sa relation avec l'insulino-résistance. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066022 . tel-01360569

HAL Id: tel-01360569

<https://theses.hal.science/tel-01360569>

Submitted on 6 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Physiologie et Physiopathologie

Présentée par
Sophie Reggio

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**La Membrane Basale du Tissu adipeux :
son remodelage au cours de l'obésité et sa relation avec l'insulino-résistance**

Soutenue publiquement le 22 janvier 2016

Devant le jury composé de :

Pr Patricia Serradas

Présidente du jury

Dr Marie-Christine Rio

Rapporteur

Dr Philippe Gual

Rapporteur

Dr Laurent Muller

Examineur

Pr Bruno Fève

Examineur

Drs Danièle Lacasa et Joan Tordjman

Directrices de thèse

**« Tout est possible à qui rêve, ose,
travaille et n'abandonne jamais »**

Xavier Dolan, Mai 2014

Remerciements

J'adresse toute ma gratitude au Pr Patricia Serradas pour avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi qu'au Dr Marie-Christine Rio et Dr Philippe Gual pour leur analyse de mon manuscrit, leurs corrections et leurs conseils. Je tiens également à remercier le Dr Laurent Müller et le Pr Bruno Fève pour leur participation à mon jury dans un premier temps de mi-thèse et aujourd'hui de thèse.

Mes remerciements vont ensuite bien entendu à mes directrices de thèse sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour, les Drs Danièle Lacasa et Joan Tordjman. Je te remercie Joan pour m'avoir aidée dès mon stage de Master 1, et offert la possibilité de réaliser une thèse au sein de ce laboratoire et d'autant plus sur un sujet aussi large. Tu m'as laissé une liberté totale pour envisager toutes les hypothèses possibles. J'exprime également ma profonde reconnaissance à Danièle Lacasa qui m'a guidé dans la mise en place des hypothèses et des expériences pour mener à bien ce projet de thèse. Je vous remercie également malgré votre départ pour votre présence et votre aide précieuse dans la rédaction de mon manuscrit et mon papier.

Je remercie très sincèrement le Pr Karine Clément pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de faire cette thèse ainsi que pour sa présence et son soutien marquant auprès de ma famille. Je tenais également à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir permis de terminer mon travail de thèse en me proposant des solutions et en ne doutant jamais de mes capacités à aller jusqu'au bout.

La fin de mon travail de thèse a été particulièrement facilitée par la fondation ICAN me donnant l'opportunité de la terminer dans les meilleures conditions possibles.

Il m'est impossible d'oublier dans ces remerciements Christine Rouault pour son aide, ses conseils, sa présence et son écoute extrêmement précieuse, sans qui l'aboutissement de ma thèse et d'autant plus la fin de ma thèse n'aurait jamais pu être envisagée. Merci d'avoir été présente tout au long de ces années (expérimentalement et humainement) et de m'avoir aidée à appuyer sur le bouton pour l'envoi de mon papier.

Je remercie chaleureusement l'ensemble de l'équipe Nutriomique et notamment Maria, Meriem, Hedi, Charles, Sothea, et tous les autres, Arnaud, Sonia, Celine, Omran, Tuong, pour nos discussions sur tout et n'importe quoi nous permettant de nous échapper pendant quelques instants des manips qui ne

ne fonctionnent pas, du p égale à 0.06, des articles contradictoires que l'on ne comprend pas, des aléas de la recherche.

Enfin ce manuscrit n'aurait jamais pu voir le jour sans le travail acharné et la confiance qu'ont eu en moi le Dr Abdenmour et son équipe. Mes remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour ma mère qui a toujours présente, qui m'a soutenu (au sens propre comme au figuré) et qui n'a jamais douté de mes capacités à pouvoir me relever malgré les épreuves. Merci également à Flavien (un relecteur et correcteur hors pair), Jérôme et tous les autres membres de ma famille (ma grand-mère, Nathalie, Marine, Sylvain) qui ont cru en moi et ont toujours été présent.

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	6
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	8
<u>INTRODUCTION</u>	
I. L'OBESITE : UNE EPIDEMIE MONDIALE.....	10
A. Définition de l'obésité.....	10
B. Epidémiologie de l'obésité.....	11
1. Dans le monde.....	11
2. En France : étude ObEpi en 2012.....	12
C. Causes de l'obésité.....	13
D. Conséquences de l'obésité.....	15
E. Traitements de l'obésité.....	17
1. Les traitements médicamenteux.....	17
2. La prise en charge chirurgicale : la chirurgie bariatrique.....	18
II. HETEROGENEITE DU TISSU ADIPEUX ET IMPLICATION AU COURS DE	
L'OBESITE.....	21
A. Le Tissu Adipeux brun chez l'Homme : un tissu anti-obésogène.....	21
1. Physiologie du TA brun.....	21
2. Identification et localisation du TA brun chez l'adulte humain.....	22
3. Activation du TA brun et son potentiel rôle thérapeutique.....	24
B. Le Tissu Adipeux Blanc chez l'Homme : un tissu pro-obésogène.....	25
1. Localisation anatomique du TAB : impact sur l'obésité et ses complications.....	26
2. Composition cellulaire du TAB physiologique et son remaniement au cours de l'obésité.....	29

III. L'ADIPOCYTE : CHEF D'ORCHESTRE DU METABOLISME ET SON RÔLE DANS

L'OBESITE.....	43
A. La différenciation adipocytaire.....	43
1. Contrôle transcriptionnel de l'adipogénèse.....	44
2. Contrôle environnemental de l'adipogénèse.....	47
a. Hormone de croissance et IGF-1.....	47
b. Autres facteurs de croissance et cytokines.....	48
c. Les glucocorticoïdes.....	48
3. L'adipogénèse au cours de l'obésité.....	49
B. Le métabolisme adipocytaire.....	50
1. Synthèse des triglycérides et lipogénèse.....	50
2. Mobilisation des triglycérides : lipolyse.....	53
IV. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU TISSU ADIPEUX BLANC : STRUCTURE, DYNAMIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIE.....	57
A. Les composés de la MEC : le « matrisome ».....	58
1. Les collagènes.....	58
a. Structure et synthèse des collagènes.....	58
b. Assemblage des collagènes et classification.....	62
2. Les fibres élastiques.....	68
a. L'élastine.....	68
b. Les microfibrilles.....	69
3. Les glycoprotéines d'adhésion.....	71
a. La fibronectine.....	71
b. Les tenascines.....	72
4. Les protéoglycanes.....	73
5. Les protéines matricielles.....	74
B. La Membrane Basale : une MEC spécialisée.....	75
1. Composition de la Membrane Basale.....	76
a. Le collagène IV.....	76

b. Les laminines.....	78
c. Les nidogènes.....	80
d. Le perlecan.....	81
2. Les récepteurs cellulaires.....	83
a. Les intégrines.....	83
b. Les dystroglycane.....	85
c. Discoidin Domain Receptor.....	86
C. Remodelage physiologique et physiopathologique de la MB.....	88
1. Assemblage de la MB.....	88
2. Dégradation des composés de la MB.....	91
a. Les Matrix Metalloprotéinases.....	91
b. Les adamalysines (ADAM et ADAMTS).....	94
c. Autres protéases de dégradation de la MB.....	94
3. Pathologies de la MB.....	95
a. Pathologies héréditaires de la MB.....	95
b. Pathologies environnementales de la MB.....	97

PROJET DE RECHERCHE ET RESULTATS

Hypothèse de travail et démarche expérimentale.....	102
--	------------

RESULTATS N°1 : Relation entre fibrose et rigidité du TA chez des sujets obèses morbides :

association avec le diabète.....	105
---	------------

RESULTATS N°2 : Remodelage de la Membrane Basale dans le TA au cours de l'obésité. :

relation avec l'insulinorésistance.....	107
--	------------

1. Caractérisation de la fibrose péri-cellulaire.....	107
2. Relation entre remodelage de la MB et les complications métaboliques.....	108
3. Causes du remodelage de la MB.....	109

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. Description de la Membrane Basale du TA en condition physiologique et physiopathologique.....	111
1. La Membrane Basale du TA : description et caractérisation.....	112
2. Remodelage de la Membrane Basale du TA au cours de l'obésité.....	113
II. Les conséquences de l'altération de l'expression du collagène IV dans le TA sur l'insulino-sensibilité.....	115
III. Des acteurs moléculaires distincts impliqués dans l'altération du réseau de collagène IV adipocytaire et vasculaire.....	116
<u>CONCLUSION GENERALE.....</u>	<u>121</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>123</u>
<u>ANNEXES.....</u>	<u>161</u>

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures :

Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde chez les adultes en 2008.....	12
Figure 2 : Répartition de la population française en fonction de l'IMC en 2012.....	13
Figure 3 : Les différentes techniques de chirurgie bariatrique.....	20
Figure 4 : Localisation anatomique du TA brun chez l'Homme adulte.....	24
Figure 5 : Les différentes formes d'obésité et la localisation anatomique du TAB.....	27
Figure 6 : Le réseau vasculaire dans le TAB.....	32
Figure 7 : Les cellules immunitaires dans le TAB et leur remodelage au cours de l'obésité.....	42
Figure 8 : La cascade transcriptionnelle régulant l'adipogénèse.....	46
Figure 9 : Voie de synthèse des triglycérides dans l'adipocyte.....	52
Figure 10 : Cascade lipolytique dans l'adipocyte.....	53
Figure 11 : Régulation de la lipolyse dans l'adipocyte.....	56
Figure 12 : Les événements intra- et extra-cellulaires menant à l'organisation supramoléculaire des collagènes.....	61
Figure 13 : Structure moléculaire et assemblage supramoléculaire des collagènes présents dans le TAB.....	66
Figure 14 : Organisation génomique des six gènes codant pour le collagène IV.....	76
Figure 15 : Organisation en triple hélice des trois isoformes de collagène IV.....	78
Figure 16 : Structure et fonction des laminines.....	79
Figure 17 : Structure modulaire des nidogènes.....	80
Figure 18 : Structure schématique du perlecan et de ses différents domaines d'interaction.....	82
Figure 19 : Représentation schématique du complexe dystroglycane et des ses ligands intra- et extra- cellulaires.....	86
Figure 20 : Structure schématique des Discoidin Domain Receptor.....	88
Figure 21 : Assemblage des composants de la Membrane Basale.....	91
Figure 22 : Voie de signalisation de la famille des TGF β	99

Figure 23 : Voie moléculaire de la néphropathie et de la rétinopathie diabétique médié par le	
TGFβ1.....	100
Figure 24 : Coupe histologique de biopsie de TAB de sujets obèses coloré au rouge	
picrosirius.....	101
Figure 25 : Voie physiopathologique de l'hyperglycémie.....	119

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Différences morphologiques et fonctionnelles des TAB sous-cutané et viscéral.....	29
Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques de l'état de polarisation des macrophages.....	37
Tableau 3 : Classification en sous-familles des différents types de collagènes.....	63
Tableau 4 : Les intégrines et leurs ligands.....	84
Tableau 5 : Les MMPs, leurs substrats et leurs inhibiteurs.....	93

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase	FABP : Fatty Acid Binding Protein
ADAMTS : ADAM with Thrombospondins Motifs	FAK : Focal Adhesion Kinase
AG : Acides Gras	FATP : Fatty Acid Transport Protein
AGL : Acides Gras Libres	FGF-2/-21 : Fibroblast Growth Factor
AMPc : Adenosine Mono-Phosphate cyclique	FoxP3/O1 : Forkhead box P3/O1
5'-AMP : 5'-Adénosine Mono-Phosphate	FSV : Fraction Stroma-Vasculaire
ANP : Atrial Natriuretic Peptide	G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
aP2 : Adipocyte lipid-binding Protein	Glut-1/-4 : Glucose transporter
ASC : Adipose Stem Cells	GAG : Glycosaminoglycanes
ATGL : Adipose TriGlycérine Lipase	HSL : Hormone-Sensitive Lipase
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	HSP47 : Heat Shock Protein 47
BMP-2/-4 : Bone Morphogenetic Protein	HSPG2Heparan Sulfate Proteoglycan
BNP : Brain Natriuretic Peptide	IFN γ : InterFeroN
CB1 : Cannabinoid Receptor Type 1	IGF : Insulin Growth Factor
CCL2 : Chemokine Ligand 2	IL-6-8-1 β : Interleukin
CD11c/83 : Cluster de différenciation	KLF : Krüppel-Like-factor
C/EBP α / β / δ : CCAAT-Enhancer-Binding-Protein	LAMC1 : Chaîne γ 1 de la laminine
CGI-58 : Comparative Gene Identify-58	LH1/2/3 : Lysyl Hydroxylase
COL4A1 : collagène IV chaîne α 1	LOX : Lysyl Oxidase
CTGF : Connective Tissue Growth Factor	LOX-L1/2/3 : Lysyl Oxidase Like
CXCL1/2/3 : C-X-C motif Ligand 1/2/3	LPL : Lipoprotein Lipase
DDR : Discoïdin Domain Receptor	MAPK : DG : DiGlyceride
DGAT : DiGlycerides Acyl-Transférase	MAGPMicrofibril Associated Protein
DXA : Dual energy X-ray Absorptiometry	MB : Membrane Basale
EGF-like : Epidermal Growth Factor-like	MEC : Matrice Extracellulaire
EMILIN : Elastin Microfibril Interface-Located protein 1	MG : Monoglyceride

MGL : Monoglyceride Lipase

MIP-1a : Macrophage Inflammatory Protein

MMP-2/-9 : Matrix Metalloproteinase

NC1 : Non Collagenous domain

NID-1/-2 : Nidogen-1/-2

PG : Proteoglycane

PGC-1 α : PPAR γ coactivator 1

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PKB/C : Proteine Kinase

RTK : Recepteur Tyrosine Kinase

RE : Reticulum Endoplasmique

SPARC : Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein

SREBP : Sterol Regulotary Element Binding Protein

TA : Tissu Adipeux

TAB : TA blanc

TAsc : TA sous-cutané

TA_v : TA viscéral

TG : Triglycérides

TGF- β : Transforming Growth Factor

TIMP-1/2/3/4 : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TNF- α : Tumor Necrosis Factor

INTRODUCTION

I. L'obésité : une épidémie mondiale

A. Définition de l'obésité

En 1997, l'obésité a été reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une maladie en tant que telle. Elle se définit comme « une accumulation excessive de masse grasse corporelle ayant des conséquences néfastes sur la santé ». L'indice de masse corporelle (IMC) ou indice de Quetelet est une mesure utilisée dans l'évaluation de la corpulence d'une personne. Elle se calcule par la mesure du poids (kg) sur la taille au carré (m^2) et permet de classifier la personne adulte en fonction de sa corpulence. Cependant l'IMC n'est qu'un indice et ne permet pas d'évaluer précisément la composition (masse maigre/masse grasse) et la répartition de la masse grasse chez un individu. En complément de l'IMC, le rapport taille (cm) sur hanche (cm) (RTH) donne une approximation de la répartition de la surcharge pondérale chez un individu. Ce dernier doit être inférieur à 1 chez l'homme et à 0,85 chez la femme. Ces deux outils permettent chez un individu d'estimer sa corpulence et son risque de développer des complications associées à l'obésité.

Si l'état du sujet le nécessite, une étude plus poussée quantifiant précisément l'indice de masse grasse est réalisée. Cette méthode d'imagerie médicale appelée la DXA (Dual energy X-ray Absorptiometry) est basée sur la mesure de l'atténuation de deux faisceaux de rayons X d'énergies différentes à travers les tissus. Ainsi, l'indice de masse grasse doit être compris entre 25-30% chez la femme et 15-20% chez l'homme.

Selon ces différents indices, un individu est considéré comme obèse lorsqu'il présente un IMC supérieur à $30\text{kg}/m^2$, un RTH supérieur à 1 pour un homme et à 0,85 pour une femme et/ou un indice de masse grasse supérieur à 20% ou 30% pour les hommes et les femmes respectivement. Le risque de développer des pathologies en relation avec la surcharge pondérale augmente alors exponentiellement avec l'augmentation de ces différents indices.

Différents degrés d'obésité ont été établis en fonction de l'IMC : la gravité de chaque forme augmente parallèlement à la valeur d'IMC du sujet. Ainsi, lorsqu'un individu présente un IMC supérieur à 40

kg/m², on parle d'obésité morbide ou sévère. C'est à partir de ce seuil que le taux de mortalité augmente fortement et que l'obésité est véritablement considérée comme une maladie. Ce phénomène semble inquiétant car la proportion de personnes en France ayant un IMC supérieur à 40kg/m² a doublé en 5 ans atteignant 1.2% de la population française en 2012 (Etude ObEpi-Roche, 2012).

B. Epidémiologie de l'obésité

1. Dans le monde

Depuis 1980, le nombre de personnes obèses a doublé dans le monde. Ainsi en 2008, l'OMS recensait 35% de personnes en surpoids et 12% de personnes obèses (<http://apps.who.int/gho/data/node.main.A900>). La répartition de l'obésité dans le monde est hétérogène (Figure 1) et peut atteindre plus de 30% de la population dans certaines régions. C'est le cas par exemple dans l'état du Mississippi aux Etats-Unis où, en 2013, 34,6 % de la population adulte était obèse (d'après America's Health Ranking : <http://www.americashealthrankings.org/>). L'un des phénomènes les plus inquiétants dans cette épidémie d'obésité est probablement son expansion rapide à des pays émergents tels que la Chine ou l'Inde. Ainsi en Chine, selon les spécialistes, l'une des conséquences de la politique de l'enfant unique le plaçant au cœur de la famille, est l'évolution exponentielle de l'obésité infantile. De ce fait, chaque année, le nombre d'enfants obèses en Chine augmente de 8% (Wu, 2006).

L'obésité reste le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial et est devenue un véritable enjeu de santé publique, ce qui a conduit de nombreux pays à mettre en place des programmes de prévention.

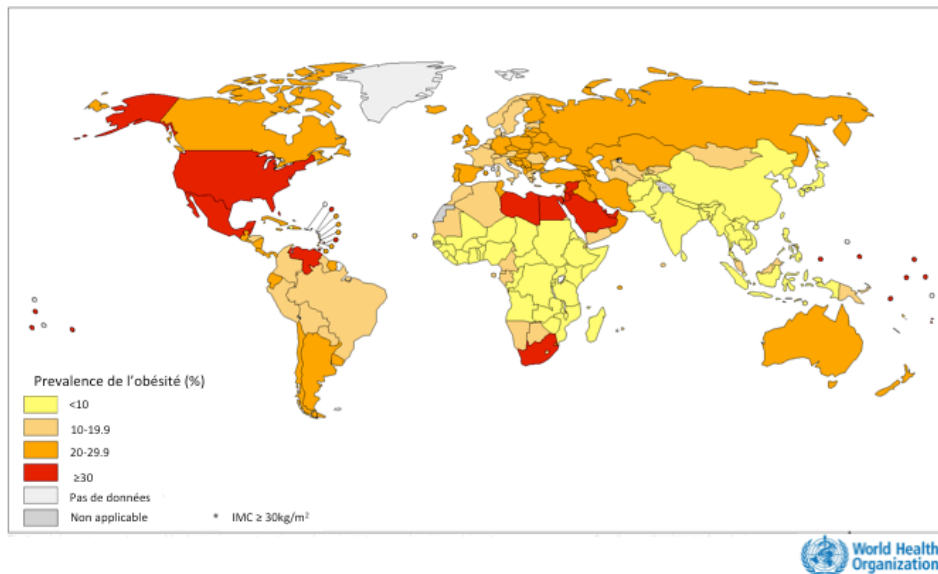


Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde chez les adultes en 2008

d'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé)

2. En France : étude ObEpi en 2012

En France, un programme de prévention, le Plan National Nutrition Santé (PNNS), a été mis en place (<http://www.mangerbouger.fr/pnns/>) en ayant pour objectif principal de promouvoir les recommandations des nutritionnistes et des scientifiques auprès de la population. Il permet également de recenser tous les trois ans la proportion de personnes en surpoids ou obèse sur un échantillon de Français. La dernière étude publiée en 2012 a révélé que 32,3 % des français étaient en surpoids et 15% de la population française était obèse (Figure 2) (ObEpi Roche, 2012). Depuis 1997, date de mise en place de cette étude, le poids des français a augmenté de 3,6 kg en moyenne. Néanmoins, la dernière étude a révélé que l'augmentation de la prévalence de l'obésité observée tous les trois ans a ralenti de manière significative ces trois dernières années par rapport aux années précédentes. Cependant, ce résultat encourageant ne signifie pas que l'épidémie d'obésité est endiguée en France et tous les efforts déployés jusqu'à présent doivent être maintenus notamment dans les populations les plus à risque.

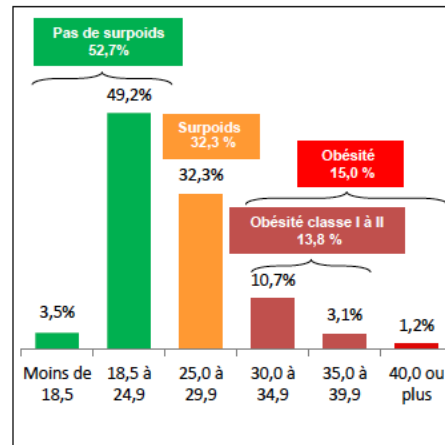


Figure 2 : Répartition de la population française en fonction de l'IMC en 2012

ObEpi-Roche 2012

C. Causes de l'obésité

L'obésité est une maladie complexe et multifactorielle résultant d'une interaction entre une multitude de facteurs génétiques et environnementaux (Basdevant, 2006; Dubern and Clément, 2007). Le déséquilibre de la balance énergétique est à la base de la prise de masse grasse et de l'évolution de l'obésité. En 2002, l'OMS et la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) démontraient l'évolution des habitudes alimentaires dans le monde. Ce rapport soulignait le rôle de l'industrialisation et de la mondialisation dans l'évolution des pratiques alimentaires des populations avec une tendance, en particulier, à la consommation d'aliments plus riches en énergie. À un apport alimentaire excessif, s'est récemment surajoutée la sédentarité des populations. Du fait du développement des transports, des moyens de communications et de la mécanisation du travail, l'activité physique a fortement diminué, ne permettant plus de contrebalancer l'apport énergétique et par conséquent aboutissant à la prise de masse grasse. Néanmoins, nous ne sommes pas tous égaux face à l'obésité et il est maintenant établi que la surcharge pondérale est influencée par l'hérédité. Ainsi, 30 à 80% de la variation du poids est déterminée par la génétique et le risque d'être en surpoids est 2 à 8 fois plus important chez les individus ayant des antécédents familiaux.

L'existence de formes monogéniques d'obésité démontre le rôle de la génétique dans l'évolution de cette maladie. À l'heure actuelle, seuls 8 gènes ont été impliqués dans l'obésité génétique (LEP, LEPR, MC4R, POMC, PCSK1, BDNF, NTRK2, SIM1). Les porteurs de ces mutations présentent un

risque accru de développer une obésité, qui sera, dans la plupart des cas, massive. Ces gènes codent le plus souvent pour des protéines impliquées dans la régulation de la prise alimentaire ou la dépense énergétique. C'est le cas par exemple des gènes codant pour la leptine ou le récepteur de la leptine dont les mutations génèrent une dérégulation de la prise alimentaire caractérisée par une hyperphagie (Clément et al., 1998; Montague et al., 1997). Un autre gène très étudié et impliqué dans les formes monogéniques de l'obésité est le gène MC4R (MelanoCortine type 4 receptor). Celui-ci code pour le récepteur aux mélanocortines régulant l'homéostasie pondérale. Son activation a pour effet d'inhiber la prise alimentaire. Une mutation sur ce gène a donc également un impact sur ce processus (Lubrano-Berthelier et al., 2003). L'obésité monogénique est rare et représente seulement 5% des cas de surcharge pondérale. Les formes communes d'obésité (95% des personnes obèses) sont souvent le résultat de l'interaction entre génétique et environnement.

Différents composants et événements extrinsèques peuvent avoir un impact sur la surcharge pondérale :

- Le « processus de précarisation » (JP Poulain, Sociologie de l'obésité) signifiant que le statut socio-économique est un facteur discriminant dans l'obésité. En effet, les études ObEpi menées depuis 1997 ont révélé une corrélation négative entre les revenus des foyers, les professions et l'IMC et ce malgré un ralentissement de l'épidémie d'obésité en France depuis 2012.
- Des facteurs psychologiques comme la dépression ont également un impact sur la prise de poids. Ce phénomène semble toucher essentiellement les femmes et 50% des personnes obèses en demande de chirurgie présentent des troubles psychologiques tels que la dépression ou l'anxiété (Berman et al., 1993). L'un des problèmes majeurs de la relation entre obésité et dépression est le cercle vicieux dans lequel entrent les personnes obèses. L'estime de soi et la vision de son corps sont des facteurs à prendre en compte dans le traitement de l'obésité.
- Dans les années 2000 une nouvelle hypothèse a émergé reliant l'effet de certains polluants chimiques à l'obésité (Grün and Blumberg, 2006). Ces produits chimiques dits « obésogènes » sont contenus dans les pesticides, les emballages alimentaires (BPA ou phthalates) notamment. Ces perturbateurs endocriniens en se fixant sur un récepteur hormonal ont la capacité de mimer l'action d'une hormone endogène de manière incontrôlée. Ces

molécules ont notamment des effets sur les cellules de la masse grasse. Une étude a, par exemple, montré l'effet du bisphénol A sur l'activation de l'adipogénèse, c'est à dire la différenciation de précurseurs en cellules graisseuses matures (Masuno et al., 2002). Le bisphénol A n'est qu'un exemple parmi d'autres et de nombreuses autres molécules sont maintenant mises en cause comme ayant des effets « obésogènes » (Grün and Blumberg, 2006).

- L'environnement *in utero* est également un facteur important dans la prédisposition à l'obésité. Des études ont ainsi montré que le diabète gestationnel, qui correspond à un état diabétique transitoire chez la femme enceinte, pouvait être associé à un risque accru d'obésité chez les enfants (Yogev and Visser, 2009). Des études ont également montré que le mode de vie de la mère au cours de la grossesse avait un impact sur le risque d'obésité infantile. En 2006, l'équipe de Bruce Blumberg a ainsi rapporté que certains polluants chimiques pouvaient reprogrammer le métabolisme des embryons en favorisant la prise de poids ultérieure (Grün and Blumberg, 2006).

D. Conséquences de l'obésité

L'obésité tue trois fois plus que la faim dans le monde. Cette maladie est, en elle-même, un facteur favorisant la mortalité mais ce sont surtout les conséquences pathologiques de la surcharge pondérale qui sont à l'origine de la surmortalité. Il est aujourd'hui établi que l'obésité est associée à un état inflammatoire de bas grade (Cottam et al., 2004) caractérisé par des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires élevés telles que la CRP (C-reactive Protein) (Visser et al., 1999) et l'IL-6 (Interleukine 6) (Kern et al., 2001). Chez les individus en surcharge pondérale, cet état inflammatoire favorise le développement de nombreuses comorbidités et notamment des complications métaboliques.

On distingue trois grandes anomalies métaboliques :

- Le diabète de type 2 est une maladie chronique résultant de l'altération du métabolisme glucidique. Il se caractérise par une hyperglycémie à jeun et/ou post-prandiale. Ce phénomène est la conséquence d'un défaut de sécrétion d'insuline par le pancréas et/ou d'une mauvaise utilisation de cette hormone par les tissus périphériques. La dérégulation glycémique qui en résulte est à l'origine de lésions tissulaires comme la rétinopathie et la néphropathie diabétiques. L'insulino-résistance existant au niveau des tissus périphériques tels que le foie ou les muscles constitue un des points clés dans la mise en place du diabète de type 2 ; celle-ci est liée à une inflammation chronique de bas grade. En effet, de nombreuses études ont montré que des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β altéraient la voie insulinaire dans les tissus sensibles à cette hormone hypoglycémisante (Olefsky and Glass, 2010; Steinberg et al., 2006).
- Les maladies cardiovasculaires sont un autre type de pathologies liées à la surcharge pondérale. Elles recouvrent un ensemble de maladies pouvant toucher le cœur et les vaisseaux. Parmi celles-ci, on retient l'hypertension artérielle, l'insuffisance coronaire et cardiaque et les thromboses veineuses. Les maladies cardio-vasculaires sont souvent la conséquence d'une dyslipidémie c'est à dire d'une concentration anormale de lipides dans la circulation sanguine s'accumulant alors dans les tissus et créant un état inflammatoire qui favorise un dysfonctionnement des systèmes vasculaires et cardiaques (Franssen et al., 2011).
- Enfin le foie est un tissu important dans le métabolisme glucidique et dans sa régulation. Il est donc sensible à un déséquilibre de la balance énergétique. La stéatose hépatique non alcoolique, définie comme une accumulation de lipides dans le tissu hépatique, constitue la première étape de la NAFLD (Non Alcoholic fatty Liver Disease) évoluant vers une inflammation du tissu hépatique, la NASH (Non Alcoholic Steato-Hepatitis) et aboutissant dans la majorité des cas à une cirrhose (Tailleux et al., 2012).

L'inflammation chronique de bas grade caractéristique de l'obésité est également un facteur de risque important de cancers des systèmes reproducteurs (endomètre et sein) et gastro-intestinaux (colôn)(van

Kruijsdijk et al., 2009). En 2003, une étude a estimé que le surpoids et l'obésité étaient responsables de 14% et 20% de la mortalité par cancer respectivement chez l'homme et la femme (Calle et al., 2003). Différentes voies de signalisation seraient impliquées dans le lien qui existe entre obésité et cancer. Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF α induiraient par exemple une prolifération et une survie cellulaire favorisant les cellules cancéreuses (van Kruijsdijk et al., 2009). Ce phénomène serait la conséquence d'une communication étroite entre la masse grasse et les cellules cancéreuses (Motrescu and Rio, 2008).

Enfin, l'obésité est à l'origine d'autres complications non métaboliques. Ainsi, la surcharge pondérale induit des complications ostéo-articulaires dues à une hyperpression sur les articulations porteuses. Celle du genou est fortement touchée et les sujets obèses ont trois fois plus de risque de développer une gonarthrose (Freedman Silvernail et al., 2013). Le rachis subit également des déformations qui peuvent générer des hernies discales.

L'obésité est également la cause du Syndrome d'Apnées obstructives du Sommeil (SAS). Le SAS est le résultat d'un effort au cours du sommeil pour lutter contre une obstruction des voies respiratoires. Il peut avoir des conséquences graves en induisant une hypoxémie chronique avec une diminution de la pression partielle en oxygène ainsi qu'une élévation des taux circulants de facteur inflammatoire (Minoguchi et al., 2004; Paiva and Attarian, 2014; Shamsuzzaman et al., 2002; Vgontzas et al., 1997).

Ce sont donc toutes ces comorbidités en lien avec l'obésité qui ont des conséquences délétères sur la santé de l'individu et qui augmentent son risque de mortalité. Il est donc nécessaire de traiter l'obésité afin de limiter ces complications.

E. Traitements de l'obésité

1. Les traitements médicamenteux

Le traitement de l'obésité est rendu complexe de par ses origines diverses faisant intervenir la personnalité et l'histoire personnelle du sujet. L'une des premières étapes dans le traitement de l'obésité est de réapprendre aux sujets obèses à réguler leur balance énergétique en favorisant l'exercice physique et un meilleur apport alimentaire (Fock and Khoo, 2013). Néanmoins, les régimes

et l'activité physique seuls ne sont pas efficaces dans les cas des obésités morbides et la pharmacopée permet alors d'accompagner à la perte de poids. De nombreuses molécules ont été mises sur le marché et retirées à cause de leurs effets secondaires multiples. Voici une liste non-exhaustive de différentes molécules choisies pour leurs modes d'actions distincts :

- Le Rimonabant est un antagoniste du récepteur aux cannabinoïdes, CB1. Cette molécule a été mise sur le marché en 2006 et est en vente dans 56 pays malgré le désaccord de la FDA (Food and Drug Administration). Puis en 2009, le Rimonabant a été retiré du marché dans les pays européens après avoir été mis en cause dans des états de dépression et des idées suicidaires (Christensen et al., 2007).
- Le Sibutramine ou Sibutral© est une autre molécule ayant des effets anorexigènes en inhibant la recapture de l'adrénaline et de la noradrénaline. Après 12 mois de prise de la molécule, les sujets étudiés perdaient 4,5 kg en moyenne. Cependant, du fait de son effet sur les catécholamines, le Sibutral favoriserait les maladies cardio-vasculaires. Il a donc été retiré du marché en 2010 (Kushner, 2012).
- L'Orlistat/Xenical agit sur l'absorption des graisses en inhibant des lipases gastro-intestinales. Des études ont montré qu'après 1 ou 2 ans de prise de la molécule, les sujets perdaient en moyenne 10% de leur poids initial (contre 5% sous placebo). L'Orlistat est en vente libre depuis 2009. Néanmoins, de par son rôle dans la malabsorption des graisses, ce traitement est à l'origine d'effets indésirables et inconfortables (Kushner, 2012).

Malgré tous les efforts développés par l'industrie pharmaceutique pour trouver la molécule miracle, les effets de la pharmacothérapie sur l'obésité sont modestes surtout sur les obésités massives.

2. La prise en charge chirurgicale : la chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique est une des solutions proposées dans le traitement de l'obésité morbide. Les individus éligibles à ce type d'opération doivent donc présenter soit un IMC supérieur à 35kg/m² associé à au moins une comorbidité, soit avoir un IMC strictement supérieur à 40kg/m² (Buchwald et al., 2009). Il existe trois types de chirurgies bariatriques adaptées aux caractéristiques individuelles des patients et aux résultats escomptés.

- L'anneau gastrique est le plus connu. Cette chirurgie réversible a pour principe de réduire le volume de l'estomac. L'anneau est posé autour de la partie haute de l'estomac et consiste en une « bouée » gonflable, reliée par un tube à un boîtier implanté sous la peau de la paroi abdominale (Figure 3A). Cette bouée peut ainsi être gonflée et dégonflée ce qui rend l'anneau gastrique ajustable. La portion de l'estomac recevant les aliments est très rapidement remplie créant un effet de satiété précoce. Néanmoins, pour que l'anneau soit efficace sur la perte de poids, les sujets doivent suivre un régime strict en évitant les liquides caloriques ou les aliments mous qui peuvent passer au travers de l'anneau. De plus au cours du repas, les aliments doivent être correctement mastiqués pour leur permettre de rejoindre l'intestin. A l'issue de cette opération très peu à risque (0,1% de mortalité opératoire), les sujets perdent en moyenne 40 à 60% de l'excès de poids après 3 à 5 ans. Cependant, dans certains cas à l'issue de ces 5 ans, certains patients peuvent reprendre du poids (Kopelman, 2005). De plus, des complications associées à cette chirurgie peuvent survenir dans certains cas comme des vomissements, des glissements de l'anneau ou une dilatation de la poche au dessus de l'anneau.
- Une autre technique opératoire est la « *sleeve* » gastrectomie. Cette opération consiste, par un système d'agrafage, à retirer 80% de l'estomac et à le transformer en un tube en continuité avec l'œsophage (Figure 3B). Cette technique induit une perte de poids à la fois par son effet restrictif mais également hormonal. Elle est plus efficace que l'anneau gastrique mais est irréversible.
- Enfin le « *bypass* » gastrique consiste à réduire la taille de l'estomac et à court-circuiter une partie du jéjunum (Figure 3C). Ainsi, les aliments ne passent plus par l'estomac mais sont directement adressés dans la partie moyenne de l'intestin grêle. La perte de poids à la suite d'un bypass gastrique est extrêmement variable. Néanmoins, à l'issue de la première année, les patients perdent en moyenne 25% de leur poids initial et entre 60 à 80% de leur excès de poids (Käkelä et al., 2013). A plus long terme, des études ont montré que les patients pouvaient perdre de 49 à 62% de leur excès de poids (Buchwald et al., 2009; Kopelman, 2005). Le court-circuitage d'une portion de l'intestin grêle a des effets secondaires non

négligeables comme des carences vitaminiques et martiales. Des compléments alimentaires sont donc nécessaires pour pallier à ces carences nutritionnelles.

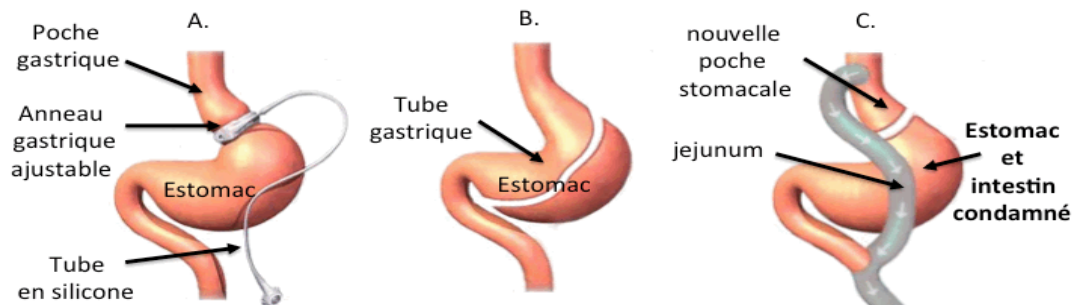


Figure 3 : Les différentes techniques de chirurgie bariatrique

(A). L'anneau gastrique. (B). La sleeve gastrectomie. (C). Le bypass gastrique

(flèches blanches : passage des aliments)

II. Hétérogénéité du Tissu Adipeux Humain et implication au cours de l'obésité

Afin de mieux comprendre la mise en place de l'obésité et des complications qui lui sont associées comme le diabète de type 2 ou les maladies hépatiques, il est crucial de s'intéresser à l'un des acteurs majeurs du métabolisme : le Tissu Adipeux (TA). Deux types de TA ont été identifiés chez les mammifères, le TA blanc et le TA brun, décrit initialement en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. Outre une apparence macroscopique différente, ces deux tissus adipeux possèdent également des activités physiologiques distinctes. Classiquement, le TA brun va jouer un rôle dans la thermorégulation en produisant de la chaleur à partir de l'oxydation des lipides alors que le TA blanc est essentiel dans le stockage des lipides et leur mobilisation en cas de demande énergétique. La définition de l'obésité ne dépend donc pas uniquement du poids de l'individu mais surtout de la quantité de TA blanc dont il est constitué. Le TA brun posséderait en revanche un rôle protecteur contre l'obésité.

A. Le Tissu Adipeux brun chez l'Homme : un tissu anti-obésogène

Le consensus sur l'existence d'un TA brun chez l'adulte n'a pas toujours existé. Pendant longtemps, ce tissu était décrit uniquement chez les mammifères et semblait présent uniquement chez le nouveau-né pour l'être humain. Sa description fonctionnelle et précise réalisée essentiellement chez le rongeur a permis de mieux comprendre le TA brun et de le mettre en évidence très récemment chez l'Homme adulte.

1. Physiologie du TA brun

Le frisson thermique génère de la chaleur mais limite les déplacements et les mouvements du corps. En revanche, chez les mammifères, l'existence d'une thermogénèse sans frisson (aussi appelée thermogénèse métabolique) permet de produire de la chaleur sans invalider l'individu. Une grande partie de cette thermogénèse métabolique est créée par le TA brun. Ce processus résulte d'un découplage particulier de la respiration mitochondriale permettant la production de chaleur. En effet, les adipocytes bruns multiloculaires (contenant plusieurs gouttelettes lipidiques) possèdent dans leur

cytoplasme un grand nombre de mitochondries leur permettant d'oxyder rapidement les substrats. La présence dans ces mitochondries d'une protéine découplante UCP-1 (Uncoupled Protein-1) permet un fort découplage de la respiration. Les adipocytes bruns vont ainsi utiliser leurs réserves lipidiques non pas pour produire de l'ATP mais libérer de la chaleur. Ce canal protéique, UCP-1, situé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie permet la dissipation du gradient de protons. L'énergie dissipée va ainsi produire de la chaleur. Le TA brun étant très vascularisé, la chaleur va être transférée dans la circulation sanguine pour être distribuée à l'ensemble des tissus de l'organisme.

L'expression et l'activité de la protéine UCP-1 sont des processus extrêmement régulés et permettant de moduler directement la thermogénèse métabolique (Golozoubova et al., 2006). L'exposition au froid est l'un des premiers facteurs à l'origine de l'activation de cette protéine et par conséquent du TA brun. Cependant, des études ont mis en évidence la présence d'autres acteurs moléculaires pouvant moduler la thermogénèse. Ainsi, le système adrénergique est le second plus puissant activateur de l'expression et de l'activité d'UCP-1. En effet, des études ont mis en évidence l'expression du récepteur β 3-adrénergique au niveau des adipocytes bruns murins (Cannon and Nedergaard, 2004). Ainsi, l'utilisation d'agonistes de ce récepteur active le TA brun induisant la thermogénèse métabolique. Enfin, d'autres facteurs semblent impliqués dans la modulation de l'activité du TA brun tels que les hormones thyroïdiennes (Abelenda and Puerta, 1992). Ces données sont issues d'études réalisées essentiellement chez les rongeurs.

2. Identification et localisation du TA brun chez l'adulte Humain

Chez l'Homme, pendant longtemps, le TA brun était décrit uniquement chez les nouveau-nés et semblait régresser pour disparaître à l'âge l'adulte. Néanmoins, avec l'essor des techniques d'imagerie, ce dogme a évolué pour finalement aboutir à l'existence d'un TA brun chez l'adulte. Ainsi dans les années 90, la tomographie à émission de positons au fluorodéoxyglucose a été développée en cancérologie afin de mettre en évidence les tissus consommateurs de glucose, une caractéristique tumorale. Cependant, chez certains patients, l'interprétation des données était rendue difficile par l'existence de zones hypermétaboliques situées au niveau du cou et du tronc absorbant le fluorodéoxyglucose (Engel et al., 1996). Or de par leur distribution symétrique l'un par rapport à l'autre, ces tissus ne pouvaient pas correspondre à des tumeurs. Ce n'est qu'en 2002, que T.F. Hany et

son équipe en combinant la tomographie à émission de positons au fluorodéoxyglucose et la tomodensitométrie, une nouvelle technique d'imagerie permettant de mieux caractériser les tissus, suggérèrent que ces zones hypermétaboliques correspondaient à du TA brun (Hany et al., 2002). Cependant, ces travaux étant publiés uniquement dans des journaux spécialisés de radiologie n'avaient pas eu de suite auprès des physiologistes. Ce n'est qu'en 2007 que J. Nedergaard relança le débat sur la présence d'un TA brun chez l'Homme adulte (Nedergaard et al., 2007). En se replongeant dans les données apportées par les radiologues et en y ajoutant ses connaissances de physiologiste, il publia une revue démontrant que les indices apportés par les radiologues sur l'existence d'un TA brun chez l'adulte étaient tout à fait pertinents et qu'il était nécessaire de mieux caractériser ce tissu (Nedergaard et al., 2007).

A la suite de cet article, une série d'études émergea sur la mise en évidence du TA brun chez l'Homme adulte. Ainsi, en utilisant les mêmes techniques d'imagerie que les radiologues et en exposant des sujets sains au froid, quatre études publiées en 2009 par des équipes différentes mirent en évidence la présence de ce tissu au niveau du cou ainsi qu'au niveau des régions supraclaviculaires, paravertébrales et périrénales (Figure 4) (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Saito et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

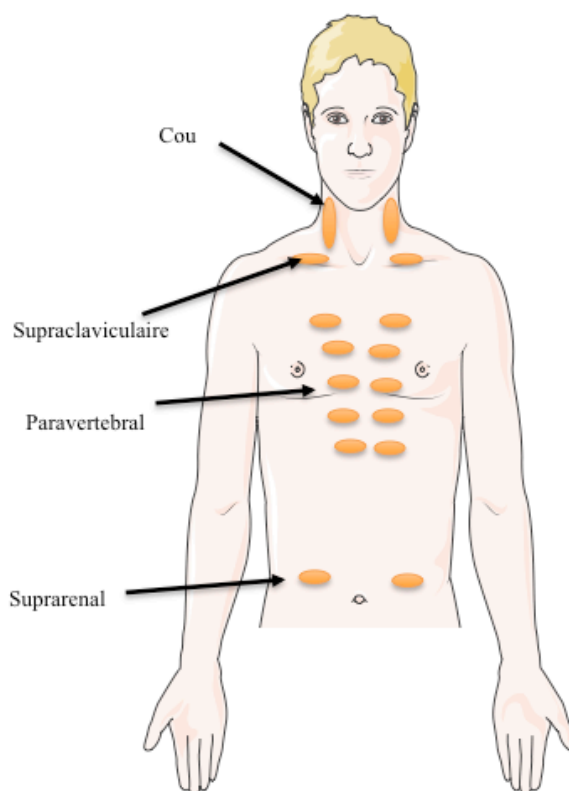


Figure 4 : Localisation anatomique du TA brun chez l'Homme adulte

Afin de mieux phénotyper ce tissu chez l'Humain, M. Saito et K.A.Virtanen, à partir de biopsie de ces zones, démontrèrent la présence d'adipocytes multiloculaires exprimant la protéine UCP-1 caractéristique du TA brun (Saito et al., 2009). De plus dans ces études, les auteurs eurent accès à des données relatives aux patients et ils purent observer une corrélation négative entre la proportion de TA brun chez un individu et son IMC. Ces résultats suggérèrent un effet protecteur du TA brun sur l'obésité et ouvrirent un champ de recherches sur la relation entre ce tissu et la mise en place de l'obésité et de ses complications.

3. Activation du TA brun et son potentiel rôle thérapeutique

Le TA brun est donc un tissu spécialisé dans la régulation de la thermogenèse métabolique en produisant de la chaleur grâce à l'oxydation des acides gras contenus dans les multiples gouttelettes lipidiques des adipocytes bruns. Le rôle de ce tissu n'est donc pas le stockage mais bien l'utilisation directe des lipides expliquant ainsi son rôle anti-obésogène. Des études récentes ont évalué l'oxydation métabolique du TA brun en mesurant l'incorporation du ^{11}C -acétate et ont démontré que

celui-ci contribuait fortement à la dépense énergétique (Ouellet et al., 2012). De plus, des études réalisées chez les rongeurs ont également démontré que la stimulation du TA brun par des agonistes β -adrénergiques prévenait la mise en place de l'obésité (Ghorbani et al., 1997). Cependant, chez l'humain, l'utilisation de ces activateurs pharmacologiques semble inefficace à ce jour (Vosselman et al., 2012).

Récemment, un nouvel acteur moléculaire, le FGF-21 (Fibroblast Growth Factor-21), a été mis en évidence dans l'activation du TA brun et semble être une piste thérapeutique intéressante dans la lutte contre l'obésité et dans ses complications métaboliques (Gaich et al., 2013). Cependant, les mécanismes cellulaires expliquant l'effet du FGF-21 sur le TA brun sont encore méconnus à ce jour. Certains auteurs suggèrent que le FGF-21 orienterait les précurseurs adipocytaires vers un phénotype brun en activant un facteur de transcription impliqué dans la « brunisation » du TA, le PGC-1 α (PPAR gamma co-activator) (Fisher et al., 2012).

Le TA brun semble donc avoir un effet anti-obésogène non négligeable. Cependant, beaucoup d'éléments concernant ce tissu et son rôle dans le métabolisme restent encore méconnus à ce jour et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires du TA brun reste encore à élucider.

B. Le Tissu Adipeux Blanc chez l'Homme : un tissu pro-obésogène

Le Tissu Adipeux Blanc (TAB) est un organe souvent mal considéré étant associé au stockage des lipides et à la masse grasse. Cependant le TAB est le seul à avoir la capacité de stocker les lipides sans que ceux-ci ne soient toxiques pour les cellules qui le constituent. Une des particularités de ce tissu est sa plasticité. En effet, le TAB peut se développer massivement comme c'est le cas chez les personnes obèses morbides auquel cas il représente 60% de la masse totale d'un individu ou au contraire s'atrophier pour représenter 5% de la masse totale chez certains athlètes (Fleck, 1983). Outre son rôle dans le stockage des lipides, dans les années 1990, des études ont révélé que le TAB avait également la propriété de sécréter des hormones telles que la leptine ou l'adiponectine, toutes deux essentielles dans la régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique. Le TAB est donc au centre du contrôle du statut nutritionnel et fait partie d'un réseau intégré permettant de maintenir l'homéostasie énergétique. Ainsi, une altération de la balance énergétique va déstabiliser cet équilibre comme c'est

le cas au cours de l'obésité. En effet, l'excès énergétique va devoir être stocké rapidement et en grande quantité afin de maintenir les constantes homéostatiques à leur état basal. Le TAB doit donc s'adapter à une entrée massive de nutriments devant être stockés. Au cours de l'obésité, l'installation d'un stress nutritionnel chronique va être à l'origine d'une augmentation massive de la masse grasse au niveau de différentes régions anatomiques favorisant ainsi les complications métaboliques.

1. Localisation anatomique du TAB : impact sur l'obésité et ses complications

C'est au professeur Jean Vague de l'Université de Marseille que revient la notion de topographie de la masse grasse. En effet, en 1947, ce médecin français avait noté que des personnes non obèses mais présentant un excès de masse grasse au niveau de l'abdomen développaient des complications associées à l'obésité telles que les maladies cardiovasculaires ou le diabète. A la suite de ses observations, deux types d'obésité avaient été définis; ces termes encore utilisés à l'heure actuelle sont basés sur la morphologie des individus (Figure 5). Ainsi, l'obésité androïde touchant essentiellement les hommes est caractérisée par un excès de masse grasse situé dans les régions supérieures du corps (épaules, abdomen). Ce type d'obésité prédispose les individus aux complications métaboliques contrairement à l'obésité gynoïde où le TAB se localise principalement dans la partie inférieure du corps (hanches, cuisses, fesses). Ce second type d'obésité est majoritairement retrouvé chez les femmes préménopausées. Récemment, les nouvelles techniques d'imagerie comme la DXA (Dual X-Absorptiometry) ont permis d'affiner cette notion en identifiant deux types de Tissu Adipeux Blanc ayant une répartition anatomique distincte (Wajchenberg, 2000)

(Figure 5).

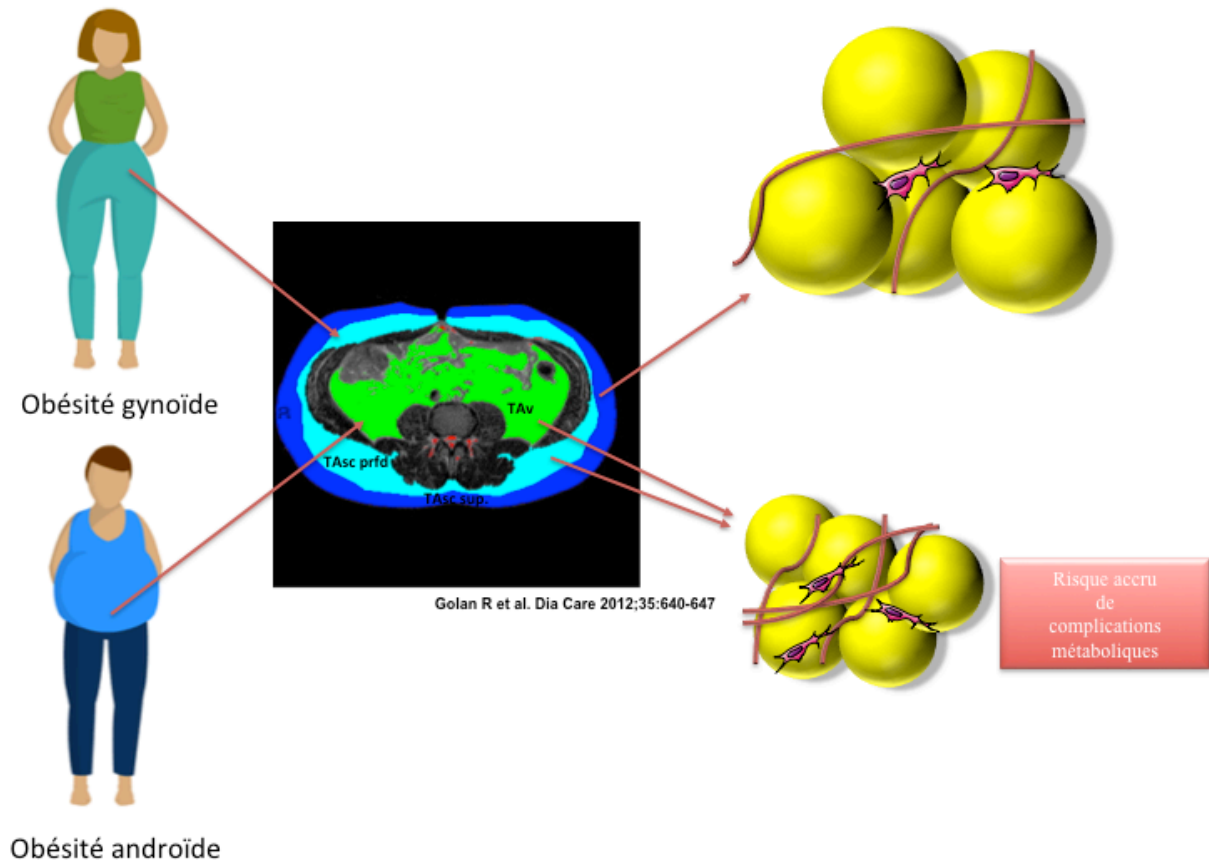


Figure 5 : Les différentes formes d'obésité et la localisation anatomique du TAB

TAsc sup. : Tissu adipeux sous-cutané superficiel ; TAsc prfd : Tissu adipeux sous-cutané profond ;
TAv : Tissu adipeux viscéral

Localisé sous le derme, se trouve le TAB sous-cutané (TAsc), qui représente 80% de la masse grasse d'un individu (Arner, 1997). Sa localisation anatomique lui confère un rôle dans le stockage des lipides mais également dans l'absorption des chocs et l'isolation thermique. De récentes études ont révélé que le TAsc était un tissu hétérogène compartimenté en deux sous-types : un TAsc superficiel en contact direct avec le derme et un TAsc profond. Ces deux sous-compartiments sont histologiquement différenciables par un tissu conjonctif qui les sépare : le *fascia superficialis* (Alexander and Dugdale, 1992; Tordjman et al., 2012). Outre cette différence anatomique, des études ont mis en évidence un profil transcriptomique et une activité métabolique différente. Ainsi, Walker et son équipe mirent en évidence que la leptine et la 11- β -hydroxystéroïde deshydrogénase (HSD), une enzyme cruciale dans la production de cortisol par le TAB, sont plus exprimées dans le TAsc superficiel (Walker et al., 2007). Le tissu adipeux blanc sous-cutané profond, quant à lui, présente une

activité lipolytique plus intense (Monzon et al., 2002). L'étude fonctionnelle de ces deux sous-compartiments ont mis en évidence que le TAsc profond étaient relativement similaire au second grand type de tissu adipeux blanc : le TAB viscéral (TAv). Ce dernier ne représente que 5-20% de la masse grasse d'un individu mais est très fortement associé aux complications métaboliques du fait de son activité biologique et de sa localisation anatomique. En effet, on distingue deux sous-types de TAv : le TAB mésentérique situé en contact étroit avec les intestins et le TAB omental situé sous le grand omentum à proximité d'organes tels que le foie. A l'heure actuelle, quelques études ont décrit le TAB mésentérique mais il reste encore quelques zones d'ombres à clarifier concernant notamment l'activité biologique de ce tissu. En revanche, le TAB omental souvent assimilé au TAv est très bien décrit dans la littérature. Les tissu adipeux blanc sous-cutané et viscéral présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles distincts répertoriées dans le Tableau 1. Ainsi, de manière non exhaustive, le TAv tous comme le TAsc profond possède une activité lipolytique intense libérant de grandes quantités de métabolites et acides gras libres. Celui-ci possède également un arbre vasculaire très développé relié au système porte du foie (Bouloumié et al., 2002). Les molécules produites par le TAv rejoignent alors directement la circulation hépatique expliquant par conséquent que ce dépôt adipeux soit plus fortement associé aux complications métaboliques se mettant en place au cours de l'obésité (Tchernof and Després, 2013). La masse de TAsc profond est également fortement associée à certaines comorbidités tel que les maladies hépatiques ou l'insulinorésistance (Tordjman et al., 2012). Pour mieux comprendre ce lien entre dépôt adipeux profond et complications métaboliques, il est indispensable d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine du fonctionnement du tissu adipeux blanc.

Différences	Tissu adipeux Sous-cutané	Tissu adipeux viscéral
Anatomiques	80% de la masse grasse	10-20% chez l'homme 5-8% chez la femme
Cellulaires	Grands adipocytes Peu vascularisé	Petits adipocytes Très vascularisé
Activités endocrines		
➤ Leptine	+++	+
➤ Adiponectine	+	++
➤ IL-6, TNF α , CRP	+	++
Activités métaboliques		
➤ Lipolytique	+	++
➤ Insulino-sensibilité	+	++

Tableau 1 : Différences morphologiques et fonctionnelles des TAB sous-cutané et viscéral (adapté de I.M. Mohsen).

2. Composition cellulaire du TAB physiologique et son remaniement au cours de

l'obésité : origine d'une inflammation chronique de « bas-grade »

Constitué principalement d'adipocytes, le TAB contient d'autres types cellulaires essentiels à son bon fonctionnement de ce tissu. Cette hétérogénéité cellulaire illustre la complexité du TAB et l'importance de comprendre les interactions et le dialogue existants entre les cellules. Une meilleure compréhension de ces interactions est d'autant plus nécessaire qu'il existe au cours de l'obésité, un stress nutritionnel chronique à l'origine d'un remodelage cellulaire du TAB créant un état inflammatoire chronique local et systémique.

En 1964, Martin Rodbell proposa une technique permettant d'isoler les adipocytes du TAB par digestion à la collagénase (RODBELL, 1964). A partir de cette méthode de séparation cellulaire, deux fractions à l'origine de la structure du TAB ont été mis en évidence: la fraction adipocytaire et la fraction stroma-vasculaire (FSV). Les adipocytes seront décrits dans le chapitre III de ce manuscrit.

La FSV est, quant à elle, à l'origine de l'hétérogénéité cellulaire du TAB. En effet, différents types cellulaires constituent cette fraction. Grâce au développement de la cytométrie en flux et la découverte de marqueurs de surface spécifiques, plusieurs types cellulaires ont été caractérisés morphologiquement et fonctionnellement.

➤ Les cellules progénitrices

Il existe, au sein du tissu adipeux blanc et notamment dans la FSV, « un pool » de précurseurs adipocytaires ayant la propriété de se différencier en adipocytes matures sous l'influence de divers signaux en particulier extracellulaires. L'adipogénèse est un processus en deux étapes permettant à partir de cellules souches mésenchymateuses présentes dans le TAB (Eto et al., 2009; Zuk et al., 2002) d'obtenir des adipocytes matures en passant par une étape de formation de progéniteurs adipocytaires.

Les cellules souches mésenchymateuses du TAB appelé ASC (Adipose Stem Cells) présentent des propriétés similaires aux MSC (Mesenchymal Stem Cells) trouvées dans la moelle rouge des os (Kern et al., 2006; Lee et al., 2004). Ces cellules souches multipotentes ont la propriété, en fonction de leur microenvironnement, de générer différents types cellulaires (ostéoblastes, myoblastes ou adipoblastes). La découverte des ASCs a ouvert la voie vers des applications cliniques. En effet, le TAB étant plus facile d'accès que la moelle rouge des os, ce tissu permet d'obtenir une grande quantité de cellules souches multipotentes pouvant ensuite sous l'influence de signaux différents produire des types cellulaires distincts. De nombreuses études ont ainsi démontré leurs propriétés thérapeutiques dans certaines maladies dégénératives telles que la sclérose en plaque ou les lésions de la moelle épinière (Marconi et al., 2013; McIntosh et al., 2013; Nakagami et al., 2005).

In vivo, ces ASCs forment un « pool » de progéniteurs pouvant se déterminer sous l'action de signaux extracellulaires vers un devenir adipocytaire et former des précurseurs adipocytaires ou préadipocytes.

Les étapes nécessaires dans la détermination des ASCs vers un profil préadipocytaires restent peu connues. Néanmoins, des études ont démontré que la présence de facteurs de croissance de la famille des TGF- β , BMP-2 et BMP-4, induisait la différenciation des cellules souches multipotentes vers la voie adipocytaire (Huang et al., 2009; Wang et al., 1993). Ainsi la présence de ces facteurs de croissance activerait PPAR γ , un facteur de transcription crucial dans la différenciation adipocytaire (Tan et al., 2012).

La purification des précurseurs adipocytaires à partir du TAB reste complexe car cet isolement nécessite l'utilisation de plusieurs marqueurs afin d'éliminer les autres types cellulaires de la FSV (Berry and Rodeheffer, 2013). Des études récentes menées chez la souris ont mis en évidence une population de cellules ayant des capacités adipogéniques avec un profil de marqueurs de surface spécifique (Lin⁻, CD 29⁺, CD34⁺, Sca-1⁺, CD24⁻) (Birsoy et al., 2008; Rodeheffer et al., 2008). Ces cellules expriment des protéines caractéristiques des précurseurs adipocytaires tels que PPAR γ 2, le facteur de transcription clé dans la différenciation adipocytaire, et sont capables de former des adipocytes même dans un microenvironnement différent du TAB (Berry and Rodeheffer, 2013). Néanmoins, chez l'Homme, l'identification précise des marqueurs permettant de purifier les précurseurs adipocytaires reste encore à préciser. En effet, ces protéines de surface mis en évidence chez les rongeurs ne présentent pas systématiquement des homologues chez l'Homme comme c'est le cas pour Sca1 (Holmes and Stanford, 2007). Cependant, une population de cellules ayant un profil CD31⁻, CD34⁺ a été mise en évidence chez l'homme. Ces cellules, mises en culture dans un environnement adipogénique, se différencient en adipocytes caractérisés par l'expression de la protéine aP2, un transporteur lipidique, et la leptine. Mais l'utilisation de ces deux marqueurs n'est pas suffisante pour une purification totale et il est nécessaire d'identifier d'autres marqueurs de surface afin d'isoler les précurseurs adipocytaires Humains et de mieux les caractériser fonctionnellement et morphologiquement.

- Les cellules endothéliales et les péricytes : altération du système vasculaire au cours de l'obésité

Le développement et l'activité d'un tissu sont intimement liés à sa vascularisation. En effet, la présence de vaisseaux sanguins est nécessaire pour délivrer de l'oxygène et des nutriments à

l'ensemble des cellules du tissu mais également pour éliminer les déchets produits. De plus, la vascularisation d'un tissu est un moyen de communication inter-organe via la sécrétion d'hormones. Le TAB et surtout le TAv est un tissu extrêmement vascularisé, chaque adipocyte étant entouré par un réseau de capillaire (Figure 6) (Bouloumié et al., 2002; Crandall et al., 1997; Silverman et al., 1988).

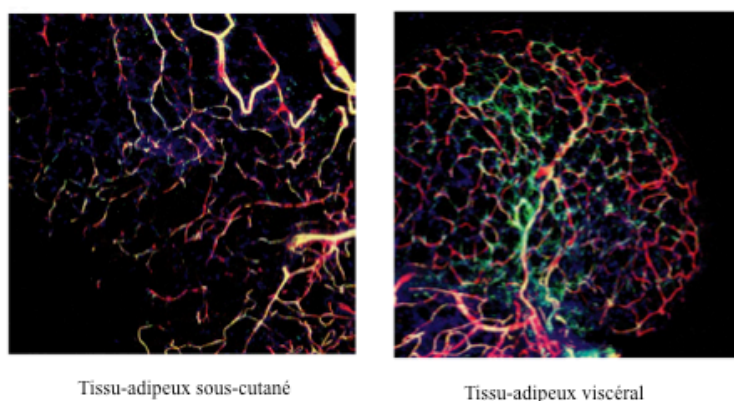


Figure 6 : Le réseau vasculaire dans le TAB (Villaret, 2010)

Marquage immunofluorescent détectant les protéines CD34 (vert) et CD31 (rouge),

Grossissement x10

Dès l'embryogénèse, la mise en place de la vascularisation et le développement du TAB sont deux processus spatialement et temporellement corrélés (Crandall et al., 1997). En effet, une étude réalisée en 1982 avait démontré qu'au cours de l'embryogénèse chez le cochon, le TAB primitif apparaissait autour des vaisseaux en formation (Hausman and Richardson, 1982). A la suite de ces observations, l'étude des voies de signalisation à l'origine de ces processus révéla que certains facteurs tels que PPAR γ , impliqué dans la différenciation adipocytaire était également impliqué dans l'angiogénèse du TAB (Fukumura et al., 2003; Panigrahy et al., 2002; Ren et al., 2002). Ainsi, l'inhibition de ce facteur de transcription par un dominant négatif induit, parallèlement à un blocage de l'adipogénèse, un défaut de formation de la microcirculation du TAB (Fukumura et al., 2003). Tous ces résultats confirment une interaction étroite entre le TAB et sa vascularisation. Ainsi, un dialogue entre les cellules endothéliales à l'origine de la formation des vaisseaux et les cellules du TAB est indispensable. D'autant plus qu'au cours de la vie adulte, le TAB est l'un des rares tissus dont la taille varie continuellement en s'adaptant au statut nutritionnel. Ces variations de la masse adipeuse doivent

alors s'accompagner d'un remaniement vasculaire afin de maintenir une pression partielle en oxygène adéquat. Les cellules endothéliales et les adipocytes vont donc communiquer directement soit par des interactions intercellulaires soit par des facteurs paracrines (Bouloumié et al., 2002; Hutley et al., 2001; Varzaneh et al., 1994). Ainsi au cours de l'expansion du TAB, l'augmentation du volume des adipocytes induit l'expression et la sécrétion d'une grande quantité de facteurs pro-angiogéniques activant les cellules endothéliales présentes pour la formation de nouveaux vaisseaux (Kuo et al., 2007; Lijnen et al., 2006). Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le principal facteur angiogénique. En réponse à une expansion du TAB, ce facteur de croissance est sécrété par les adipocytes. Le VEGF libéré va ainsi pouvoir interagir directement avec ses récepteurs, le VEGFR-1 et le VEGFR-2 portés par les cellules endothéliales, et induire l'angiogénèse (Baillargeon and Rose, 2006). Ce processus permet la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux existants dont les cellules endothéliales vont être activées par des facteurs pro-angiogéniques et migrer, proliférer et se différencier. D'autres hormones et molécules sécrétées par les adipocytes possèdent également des propriétés pro-angiogéniques. Ainsi, la leptine, adipokine connue pour son rôle dans la régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique, module également l'angiogénèse au sein du TAB (Adya et al., 2015; Bouloumié et al., 1998).

La stabilisation des capillaires du TAB dépend également de la présence de cellules nourricières : les péricytes. Mises en évidence dès le 19^e siècle, ces cellules murales sont enveloppées dans la Membrane Basale de l'endothélium (Eberth CJ, 1871) et sont par conséquent en interaction étroite avec les cellules endothéliales grâce à des prolongements cytoplasmiques (Armulik et al., 2011). Le nombre et la taille des contacts entre les péricytes et les cellules endothéliales dépendent des tissus. Ainsi le rapport du nombre de péricytes/cellules endothéliales peut varier de 1/1 à 10/1 (Armulik et al., 2005). Le tissu nerveux est l'un des tissus les plus denses en péricytes avec la présence de la barrière hémato-encéphalique contrôlant le flux sanguin (Armulik et al., 2005). Dans le tissu adipeux blanc, encore peu de données existent sur les péricytes et leurs caractéristiques fonctionnelles. Néanmoins, dans une étude récente publiée par le laboratoire, les péricytes du TAB ont été caractérisés et le ratio péricytes/cellules endothéliales dans le TAsc de sujets non-obèse est de 1,5 (Pellegrinelli et al., 2014a).

Ces données montrent l'importance d'une vascularisation fonctionnelle du tissu adipeux blanc caractérisée par la présence de cellules endothéliales formant la microvascularisation de ce tissu stabilisée par les péricytes.

Or au cours de l'obésité, le système vasculaire doit s'adapter à une expansion massive de la masse grasse afin d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires aux cellules. Ainsi, il a été démontré que le TAB de sujets obèses est soumis à une activité pro-angiogénique intense caractérisée par une augmentation de l'expression et de la sécrétion de nombreux facteurs pro-angiogéniques et notamment du VEGF (Miyazawa-Hoshimoto et al., 2003; Silha et al., 2005). Par conséquent, les cellules endothéliales sont soumises à une activation intense afin de former de nouveaux vaisseaux. Cette sollicitation excessive a alors un impact sur la fonction endothéliale. En effet, des études ont rapporté une sénescence de ce type cellulaire dans le TAB de sujets obèses et notamment dans le TAV, tissu le plus vascularisé (Pellegrinelli et al., 2014a; Villaret et al., 2010). Ces cellules sénescents vont alors induire une altération de la fonction adipocytaire via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 ; IL-6 ; CCL-2 et CCL-5) (Pellegrinelli et al., 2014a). L'acquisition de ce profil pro-inflammatoire des cellules endothéliales au cours de l'obésité va alors également participer à l'infiltration de cellules immunitaires dans le TAB et donc à une inflammation locale de ce tissu (Pellegrinelli et al., 2014a).

A l'altération de la fonction endothéliale s'ajoute un profond remaniement des péricytes. Ainsi, le laboratoire a récemment démontré que le rapport péricytes / cellules endothéliales diminuait drastiquement passant de 1,5 dans le TAsc de sujets témoins à 0,5 dans le TAsc de sujets obèses. Analogiquement aux cellules endothéliales, ces péricytes présentent un profil pro-inflammatoire sécrétant des cytokines (G-CSF ; IL-6 ; CXCL1/2/3 ; IL-8 et MIP-1a) (Pellegrinelli et al., 2014a).

Toutes ces données démontrent qu'au cours de l'obésité l'arbre vasculaire afin de faire face à l'expansion massive du TAB subit un profond remodelage induisant une altération fonctionnelle des cellules constituant les vaisseaux c'est-à-dire des cellules endothéliales et des péricytes. Ces cellules développent alors un profil pro-inflammatoire participant au remaniement des cellules immunitaires du TA au cours de l'obésité.

- Les cellules immunitaires du TAB et leur remodelage au cours de l'obésité : origine de l'inflammation chronique de bas grade

Les cellules immunitaires sont cruciales dans la protection contre l'invasion d'élément pathogène et l'expansion de tumeur. Cependant, il est maintenant admis que le système immunitaire peut également être impliqué dans des processus non-immunitaires comme la neurodégénérescence, la fonction cardiovasculaire et le métabolisme. De ce fait, un nouveau champ de recherches, l'immuno-métabolisme, a émergé ayant pour objectif de comprendre l'interaction existante entre le système immunitaire et le métabolisme. En effet, au cours de l'évolution, deux processus ont permis la survie et l'évolution des espèces : d'une part la capacité de stocker de l'énergie afin de prévenir les périodes de jeûne et d'autre part la capacité à lutter contre les pathogènes. Or ces deux processus sont intimement liés. Ainsi, l'activation du système immunitaire afin de lutter contre un élément étranger est un processus requérant beaucoup d'énergie. Basé sur ce constat, Chawla et al. ont récemment proposé une théorie appelé « Energie sur commande » (Chawla et al., 2011). Dans ce dogme, les auteurs proposent que l'invasion d'un tissu par un élément étranger va induire la libération d'une grande quantité de nutriments grâce à un dialogue entre les cellules immunitaires et les cellules stockant de l'énergie tel que les adipocytes. Le système immunitaire et le métabolisme sont deux processus biologiques extrêmement conservés et l'interaction étroite entre ces deux systèmes semble prendre une part importante dans l'évolution des espèces. Ainsi, chez des espèces primitives telles que *drosophila melanogaster*, le corps gras, équivalent du TAB et du foie, est composé de cellules stockant les lipides mais également de fragment de tissu immun permettant une interaction directe entre le tissu métabolique et immunitaire (Hotamisligil, 2006). Chez les mammifères, les ganglions lymphatiques, lieu de prolifération et différenciation des cellules immunitaires, sont entourés par le TAB périnodal. Celui-ci va libérer des acides gras libres et des adipokines pouvant moduler la différenciation et la prolifération des cellules immunitaires contenues dans le ganglion lymphatique. En retour, les leucocytes activés vont quant à eux libérer des cytokines régulant l'activité lipolytique de ce TAB afin de leur apporter de l'énergie (Knight, 2008).

Au sein du TAB lui-même et particulièrement au niveau du tissu adipeux blanc viscéral, différents types de cellules immunitaires résidentes ont été identifiées et sont impliquées dans la surveillance et

la prévention d'invasion pathogène. Cependant, la composition cellulaire du TAB est plastique et peut être régulée par des stimulations aiguës et chroniques comme le type de régime alimentaire, le statut nutritionnel ou l'exposition au froid (Kosteli et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Talukdar et al., 2012; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Par conséquent au cours de l'obésité, le stress nutritionnel chronique créé notamment par un régime gras engendre une inflammation chronique de bas-grade caractérisée par des forts taux circulants et une surexpression dans le TAB de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, le CCL-2 ou le TNF- α (ce dernier a été essentiellement mis en évidence chez la souris) (Berg and Scherer, 2005; Hotamisligil, 2006; Shoelson et al., 2007). Or la présence de ces cytokines dans la circulation n'est pas anodine et participe aux dysfonctions métaboliques en altérant la voie insulinaire dans les cellules musculaires, hépatiques et adipeuses provoquant ainsi une résistance à l'insuline de ces types cellulaires (Hotamisligil et al., 1993).

La sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires par le TAB est la conséquence d'un remaniement important des cellules immunitaires de ce tissu créant cette inflammation chronique de bas-grade caractéristique de l'obésité.

- Les macrophages du TAB

Les macrophages sont les premières cellules immunitaires à avoir été identifiées dans le TAB. C'est en 2003 à partir de l'analyse du profil transcriptomique de TAB murin, que l'équipe de Ferrante a mis en évidence l'expression d'un marqueur spécifique des macrophages, la molécule de surface F4/80 (Weisberg et al., 2003). Basé sur cette première étude, d'autres données ont démontré que les macrophages représentent 5% des cellules de la FSV chez la souris et 4% des cellules dans le TAv humain en conditions physiologiques (Harman-Boehm et al., 2007; Kanda et al., 2006; Nishimura et al., 2008). Néanmoins, au cours de l'obésité, le nombre de macrophages contenus dans le TAB augmente drastiquement atteignant 50% des cellules de la FSV dans des modèles murins d'obésité et 12% des cellules de la FSV chez des sujets obèses morbides (Harman-Boehm et al., 2007; Weisberg et al., 2003).

Les macrophages constituent une population hétérogène pouvant présenter un état d'activation différent en fonction de leur environnement local (Hume, 2015). Ainsi, classiquement, deux sous-

types de macrophages ont été décrits: les macrophages pro-inflammatoires ou M1 et les macrophages anti-inflammatoires ou M2 (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Ces deux sous-types de macrophages possèdent ainsi des phénotypes et des activités distincts décrits dans le Tableau 2. Les macrophages M1 sont impliqués dans les premières étapes de la réaction immunitaire afin d'éliminer les éléments pathogènes. Les macrophages M2 quant à eux surviennent plus tardivement et sont impliqués dans le remodelage tissulaire en libérant des facteurs régulant l'homéostasie de la Matrice Extracellulaire (MEC) afin de cicatriser le tissu lésé au cours de l'élimination du pathogène.

	Macrophages M1	Macrophages M2
Activateur	IFN γ TNF α LPS	IL-4 IL-13
Marqueurs de surface	CD86 CD80 TLR-2 TLR-4 iNOS	CD163 CD206 TGM2
Cytokines	TNF α IL-1 β IL-6 IL-12 IL-13	IL-10 TGF- β
Chimiokines	CCL10/11/5/8/9/2/3/4	CCL17/22/24

Tableau 2: Caractéristiques phénotypiques de l'état de polarisation des macrophages

(adapté de Ferrante C)

Au sein du TAB mince, les macrophages présentent une dispersion diffuse entre les adipocytes. Leur caractérisation phénotypique a révélé la présence du marqueur de surface CD206 et la sécrétion de cytokines et de molécules anti-inflammatoires comme IL-10 et arginase 1 (Chawla et al., 2011). De par ces données, les scientifiques s'accordent à dire que les macrophages résidents du TAB présentent un profil phénotypique anti-inflammatoire de type M2.

Néanmoins au cours de l'obésité, l'expression de ces facteurs anti-inflammatoires diminue drastiquement avec simultanément une augmentation de marqueurs phénotypiques pro-inflammatoires (F4/80 ; IL-6) (Lumeng et al., 2007). Cette modification du profil inflammatoire du TAB au cours de l'obésité est le résultat d'une modification de la polarisation des macrophages majoritaires vers un profil M1 ou pro-inflammatoire (Lumeng et al., 2008). Ce remodelage n'est pas la conséquence d'une transformation des macrophages M2 résidents en macrophage M1 mais d'un recrutement important des monocytes circulants se différenciant au sein du TAB obèse en macrophage pro-inflammatoire (Nguyen et al., 2011). Associé au remodelage phénotypique des macrophages, le stress nutritionnel chronique altère également la répartition de ces cellules dans le TAB. En effet, contrairement aux macrophages M2 dispersés de manière diffuse dans le parenchyme, ces nouveaux macrophages pro-inflammatoires recrutés s'agrègent en une structure caractéristique en couronnes autour d'adipocytes. Cette infiltration massive de macrophage dans le TAB obèse possède une localisation anatomique spécifique et un profil pro-inflammatoire. Ce phénomène joue un rôle majeur dans l'inflammation chronique locale et systémique observée au cours de l'obésité.

- Les lymphocytes

Plus récemment d'autres types de cellules immunitaires et notamment les lymphocytes ont été identifiés dans le TAB en condition physiologique. Comme pour les macrophages, les lymphocytes sont une population hétérogène se divisant en deux grands types : les lymphocytes T et les lymphocytes B.

Les lymphocytes T représentent une population plus importante en nombre que celle des lymphocytes B et sont au cœur de la régulation du système immunitaire. Différents sous-types de lymphocytes T ont été décrits en fonction de leurs activités biologiques et des marqueurs de surface les caractérisant.

Ainsi en conditions physiologiques, les lymphocytes T régulateurs (Treg) caractérisés par le marqueur de surface CD4 et le facteur de transcription Foxp3, sont présent en grand nombre dans le TAB sain (Feuerer et al., 2009). Néanmoins, leur nombre diminue au cours de l'obésité aussi bien dans les TAB murins qu'Humains (Feuerer et al., 2009). Or, les Tregs sont requis pour le maintien d'un environnement anti-inflammatoire via la sécrétion d'IL-10, une cytokine orientant la polarisation des macrophages vers un profil M2 (Feuerer et al., 2009). De plus, les Tregs préviennent également de l'insulinorésistance (Feuerer et al., 2009). Cependant au cours de l'obésité, cette sous-famille de lymphocytes T régresse pour laisser place à une autre population de lymphocyte, les lymphocytes T CD4+, IFN γ (Th1). Ces derniers expriment et sécrètent une cytokine hautement inflammatoire, l'IFN γ , impliquée dans les complications métaboliques (Rocha et al., 2008).

Une autre sous-famille, les lymphocytes invariant Natural Killer T (iNKT) ont été également mis en évidence dans le TAB murin et Humain en condition physiologique (Lynch et al., 2009, 2012).

Le rôle majeur de ce type cellulaire est de moduler l'état d'activation des autres cellules immunitaires en libérant des cytokines entretenant l'état anti-inflammatoire. Par conséquent, au cours de l'obésité, cette sous-population de cellules est également réduite dans le TAB (Lynch et al., 2009).

Enfin, une infiltration massive de lymphocytes T CD8+ cytotoxique a également été mise en évidence dans le TAB obèse. Ces cellules participent notamment à la polarisation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire (Nishimura et al., 2009).

Les lymphocytes B sont un sous-type de cellules immunitaires encore assez peu étudiés dans le TAB humains. Récemment, une étude a mis en évidence une corrélation négative entre l'expression du CD19 dans le TAsc (un marqueur des lymphocytes B) et l'IMC chez un groupe de sujets obèses (Nishimura et al., 2013). Les lymphocytes B produisent de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. Ces données suggèrent qu'au cours de l'obésité le nombre de lymphocytes B diminue dans le TAB participant de fait au processus de méta-inflammation.

- Les mastocytes

Les mastocytes sont impliqués dans le développement de pathologies inflammatoires et fibrotiques de nombreux tissus. Par conséquent, cette population de cellules immunitaires infiltre également de manière importante le TAB aussi bien dans des modèles murins d'obésité que chez des sujets obèses humains (Liu et al., 2009). Dans une étude récente, notre équipe a examiné précisément la localisation des mastocytes dans le TAB par des techniques d'immunohistochimie. Les données obtenues ont mis en évidence que ce type de cellule immunitaire était retrouvé dans les dépôts fibrotiques de ce tissu (Divoux et al., 2012). Ce sous-type de cellules immunitaires participe également à l'inflammation du TAB en sécrétant de nombreuses cytokines et notamment de l'IL-6 et de l'IFN γ , des molécules contribuant entre autre à la mise en place de l'insulino-résistance. Au cours de l'obésité, les mastocytes infiltrent donc le TAB et contribuent au profil inflammatoire et fibrotique de ce tissu.

- Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au niveau d'une zone d'inflammation afin de libérer après leur activation sur le site de l'inflammation de nombreuses cytokines permettant de recruter la seconde vague de cellules immunitaires que sont les macrophages, les lymphocytes et les cellules dendritiques (Mantovani et al., 2011). Ce rôle central des neutrophiles dans l'initiation de la réponse l'état inflammatoire d'un tissu soulève la question de leur rôle possible dans le TAB au cours de l'obésité. La présence de neutrophiles a été révélée dans le TAB de souris mince bien qu'ils ne représentent qu'une petite fraction de l'ensemble des cellules immunitaires de celui-ci (<1%) (Ferrante, 2013). Néanmoins, des données démontrent aussi bien dans des modèles murins d'obésité que chez des sujets obèses humains une augmentation de la proportion du nombre de neutrophiles activés localisés au niveau de l'endothélium du TAB murin et humain obèses (Rouault et al., 2013; Shah et al., 2010). La présence de ce sous-type de cellules immunitaires au niveau des capillaires du TA sous une forme activée serait à l'origine après dégranulation d'une exacerbation de l'inflammation des tissus.

- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les dernières cellules récemment caractérisées dans le TAB en condition physiologique et au cours de l'obésité (Bertola et al., 2012). En effet, leur mise en évidence est relativement complexe de par le fait qu'elles partagent avec les macrophages de type M1 l'expression du marqueur, CD11c (Domínguez and Ardavín, 2010). Néanmoins, une infiltration massive de cette sous-population de cellules immunitaires a été récemment mise en évidence dans le TAB de modèles murins d'obésité (Bertola et al., 2012). De plus, chez des sujets obèses humains, l'expression de marqueurs spécifiques des cellules dendritiques CD1c, CD11c et CD83 augmente dans le TAsc (Bertola et al., 2012). A l'heure actuelle, encore très peu d'études ont démontré le rôle joué par ce type cellulaire dans l'état inflammatoire du TAB au cours de l'obésité. Seule une étude a démontré qu'une diminution du nombre de cellules dendritiques dans le TAB réduisait l'infiltration des macrophages et est par conséquent associé à une amélioration de l'insulino-résistance dans un modèle animal d'obésité (Stefanovic-Racic et al., 2012). Cependant, il n'est pas possible à l'heure actuelle d'affirmer que cet effet est uniquement attribuable à la délétion des cellules dendritiques.

En conclusion, il est maintenant admis que le TAB constitue un organe immunitaire à lui seul. Ainsi, en condition physiologique, l'intégrité structurale et fonctionnelle dépend en partie d'un équilibre méticuleusement orchestré entre cellules immunitaires permettant de maintenir un état anti-inflammatoire et modulant ainsi l'insulino-sensibilité. Or au cours de l'obésité, le stress nutritionnel engendre un remodelage sévère du système immunitaire du TAB modifiant quantitativement et qualitativement différents sous-types de cellules (Figure 7). Le remodelage drastique du phénotype immunitaire du TAB a pour conséquence une inflammation chronique locale et systémique de bas-grade caractéristique de la physiopathologie de l'obésité.

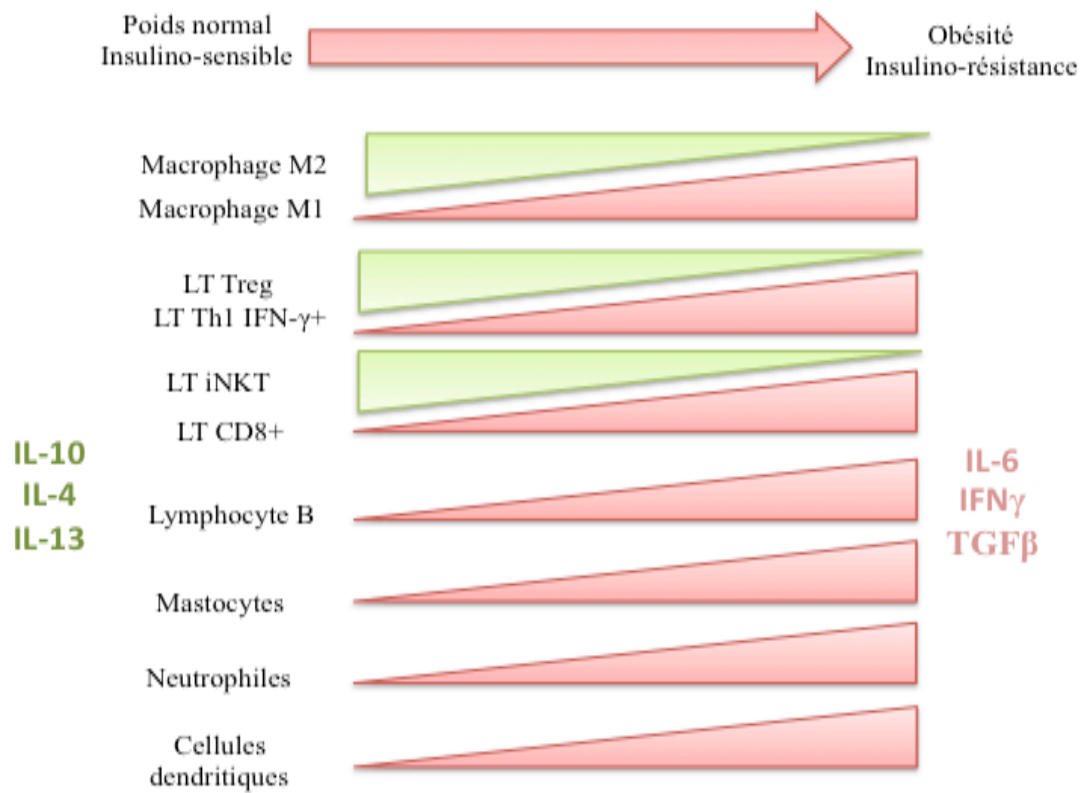


Figure 7: Les cellules immunitaires du TAB et leur remodelage au cours de l'obésité

(adapté de Schipper HS). LT: Lymphocyte T; iNKT: invariant natural killer T; Treg: T régulateurs

III. L'adipocyte : chef d'orchestre du métabolisme et son rôle dans l'obésité

Les adipocytes représentent les principales cellules du TAB et sont à eux seuls responsables du stockage de l'énergie en excès. Cette énergie est stockée sous la forme de lipides contenus dans une gouttelette lipidique (GL) sans que ceux-ci ne soient toxiques pour la cellule contrairement aux autres types cellulaires. De par cette capacité de stockage et de mobilisation des lipides en fonction du statut énergétique, la fonction biologique de l'adipocyte et par association du TAB dans sa globalité est associée au métabolisme énergétique de l'organisme. Néanmoins, la fonction biologique de ce type cellulaire ne se restreint pas au métabolisme lipidique car l'adipocyte possède des propriétés endocrines importantes participant à la régulation du métabolisme mais également de l'immunité, de la vasculogénèse et du remodelage de la Matrice Extracellulaire (Sun et al., 2011).

A. La différenciation adipocytaire

Les adipocytes matures sont des cellules ne possédant aucune propriété mitotique. L'hyperplasie adipocytaire résulte donc non pas de la prolifération des adipocytes mais de la formation de nouveaux adipocytes à partir de précurseurs cellulaires présents dans le TAB : les préadipocytes ou précurseurs adipocytaires.

De nombreuses études se sont ainsi efforcées d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la différenciation des précurseurs adipocytaire, cellules d'aspect fibroblastique, en adipocytes matures, cellules arrondies stockant les lipides (Figure 8). La plupart des connaissances obtenues sur les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation impliquées dans l'adipogénèse proviennent d'études réalisées sur des lignées cellulaires murines tels que les préadipocytes 3T3-L1 et

3T3-F442A.

1. Contrôle transcriptionnel de l'adipogénèse

L'acquisition du phénotype adipocytaire est sous la gouvernance d'une cascade de facteurs de transcription s'exprimant séquentiellement et participant à l'activation de l'expression de centaines de protéines impliquées dans la mise en place du programme adipocytaire (Figure 8). L'initiation de l'adipogénèse est déclenchée par deux facteurs de transcription, C/EBP β et C/EBP δ (CAAT Enhancer Binding Protein), dont l'expression est modulée par des hormones et notamment des hormones de croissance ou des glucocorticoïdes. Ainsi, les taux d'expression de ces facteurs de transcription atteignent rapidement un pic 48h environ après le stimuli hormonal pour ensuite diminuer. La présence de C/EBP β et C/EBP δ dans les premières étapes de la différenciation adipocytaire semble importante. En effet, la délétion de ces deux protéines chez des souris est à l'origine d'une altération de l'adipogénèse caractérisée par une lipoatrophie de certains dépôts adipeux (Tanaka et al., 1997). L'un des rôles majeurs de C/EBP β et C/EBP δ est de réguler l'expression d'un autre facteur de transcription impliqué dans l'adipogénèse: PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Ce dernier appartenant à la famille des récepteurs nucléaires PPAR a été identifié comme un acteur clé de l'adipogénèse. En effet, l'expression ectopique de PPAR γ dans des fibroblastes de souris initie le programme de différenciation adipocytaire (Tontonoz et al., 1995). L'étude *in vivo* du rôle de PPAR γ dans la mise en place du TAB s'est néanmoins heurtée à l'effet létal de l'absence de ce facteur de transcription chez la souris (Barak et al., 1999). Pour contourner ce problème, Rosen et son équipe ont injecté à des souris des préadipocytes 3T3-L1 n'exprimant pas PPAR γ . Ces cellules sont alors incapables de former un tissu adipeux blanc fonctionnel contrairement à des préadipocytes 3T3-L1 normaux (Rosen et al., 1999). Ces données démontrent l'importance de PPAR γ dans l'adipogénèse et la mise en place du TAB. Chez les mammifères, deux isoformes de PPAR γ ont été décrites, PPAR γ 1 et PPAR γ 2, générées à partir d'un promoteur alternatif. Alors que PPAR γ 1 est exprimé par de nombreux tissus, l'expression de PPAR γ 2 est restreinte aux adipocytes. Ainsi, la délétion de ce facteur de transcription dans des préadipocytes 3T3-L1 bloque totalement la différenciation de ces précurseurs en adipocytes matures. Cette inhibition est supprimée avec la présence exogène de ce facteur de transcription (Ren et al., 2002). Les gènes cibles identifiés de PPAR γ 2 sont impliqués dans le métabolisme lipidique essentiellement. Ainsi, Spiegelman et son équipe ont démontré que le transporteur des lipides, aP2, était régulé directement par ce récepteur nucléaire (Spiegelman and

Flier, 1996). La lipoprotéine lipase, une enzyme hydrolysant les triglycérides contenus dans les chylomicrons et libérant des acides gras, est également un gène cible de ce facteur de transcription (Schoonjans et al., 1996). Enfin, PPAR γ 2 possède également la propriété de réguler un autre facteur de transcription, C/EBP α , impliqué dans l'adipogénèse. Ainsi, comme pour PPAR γ 2, l'expression ectopique de C/EBP α dans des fibroblastes induit la différenciation adipocytaire (Freytag et al., 1994). De plus, *in vivo*, l'absence de ce facteur de transcription est à l'origine chez la souris d'un défaut de formation d'un TAB fonctionnel (Rieusset et al., 2002). L'un des rôles de C/EBP α est de réguler l'expression du transporteur du glucose insulino-dépendant, Glut-4 et le récepteur à l'insuline au cours de l'adipogénèse (El-Jack et al., 1999). C/EBP α est donc essentiel dans la régulation de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme glucidique et la sensibilité à l'insuline. Néanmoins, contrairement à PPAR γ 2, C/EBP α seul n'est pas suffisant pour la formation d'un adipocyte et l'absence de PPAR γ 2 empêche ce dernier de conduire le programme adipogénique (Rosen et al., 2002). Ces données démontrent que PPAR γ 2 est donc un acteur clé nécessaire et suffisant à l'élaboration d'un adipocyte fonctionnel.

Une autre classe de facteur de transcription, les Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP), participe également à l'adipogénèse. Cette famille est connue essentiellement pour son rôle dans la régulation de l'expression d'enzymes impliqués dans le métabolisme lipidique. Néanmoins, un de ces membres, SREBP1c, concourt également au programme adipogénique. Ainsi, la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 s'accompagne d'une augmentation de l'expression de ce facteur de transcription dans la cellule (Kim and Spiegelman, 1996). De plus, sa surexpression dans ce même type cellulaire va promouvoir l'adipogénèse et son action semble passer par une induction de l'expression/activité de PPAR γ (Kim and Spiegelman, 1996).

La famille des Krüppel-like factors (KLFs) a également été impliquée dans la modulation de la différenciation adipocytaire. Huit KLFs sur les 17 identifiées chez les mammifères participent à ce processus (KLF2/3/4/5/6/7/11/15) (Birsoy et al., 2008; Mori et al., 2005). Ces protéines de liaison à l'ADN vont ainsi pouvoir réguler positivement ou négativement certains gènes adipogéniques. Ainsi, la sur-expression de KLF15 dans des préadipocytes 3T3-L1 a permis de déterminer son rôle d'activateur de la différenciation adipocytaire et de l'expression du transporteur au glucose, Glut-4

(Gray et al., 2002). De plus, l'étude du promoteur de PPAR γ a révélé la présence de séquences reconnues par les KLFs. Ceci explique que la présence d'un dominant négatif de KLF15 inhibe partiellement l'expression de PPAR γ et démontre l'effet pro-adipogénique de ce facteur de transcription. Par opposition, d'autres membres de la famille des KLFs possèdent quant à eux un effet anti-adipogénique. Ainsi, l'expression constitutive de KLF2 par exemple dans des préadipocytes 3T3-L1 provoque la diminution de l'expression de PPAR γ et par conséquent inhibe de la différenciation adipocytaire (Banerjee et al., 2003).

En conclusion, l'induction de l'adipogénèse et la formation d'un adipocyte mature sont par conséquent des mécanismes complexes et hautement régulés au niveau intracellulaire. Néanmoins, la régulation de ce processus nécessite la présence de signaux extracellulaire informant la cellule sur son environnement et modulant son devenir.

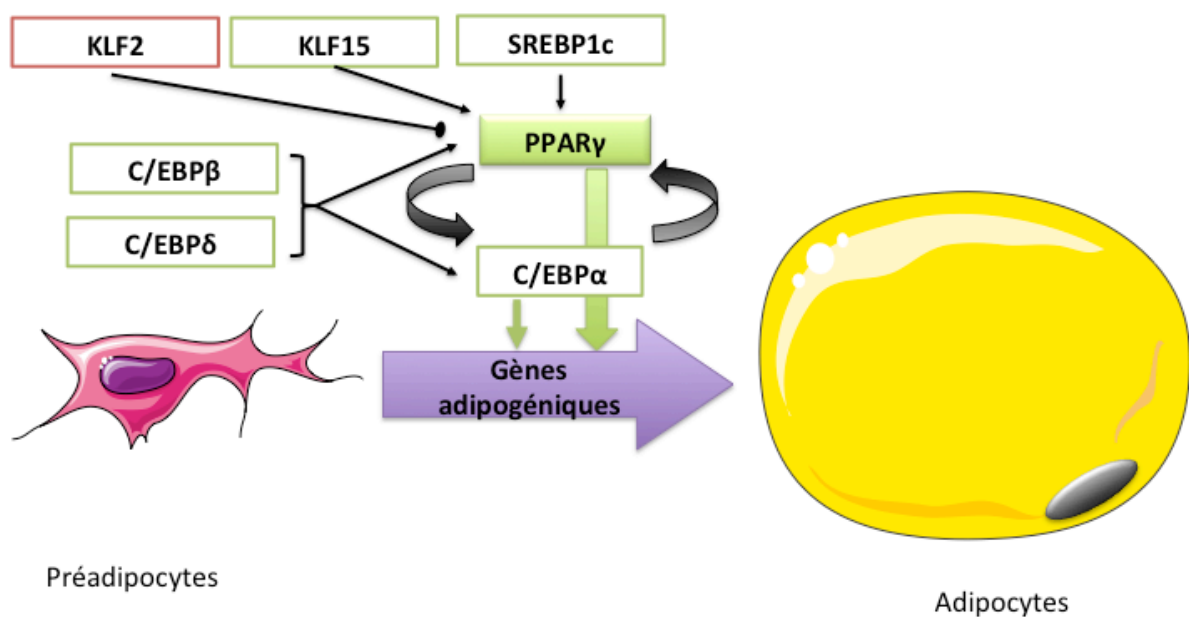


Figure 8: La cascade transcriptionnelle régulant l'adipogénèse (adapté de Rosen ED ; Nature Review)

C/EBP: CCAAT-enhancer-binding protein ; KLF : Krüppel-like factors ; PPAR : Peroxysome Proliferator Activated Receptor ; SREBP: Sterol Regulatary Element Binding Protein

2. Contrôle environnemental de l'adipogénèse

La présence de sérum de veau foetal (SVF) dans le milieu de lignée préadipocytaire induit spontanément leur différenciation en adipocyte mature. Le SVF est très riche en de nombreux facteurs de croissance et hormones. Ce phénomène démontre le rôle de facteurs extracellulaires dans le processus de différenciation adipocytaire. Néanmoins, il est très difficile de déterminer directement dans le SVF, les molécules impliquées dans l'induction de l'adipogénèse. En revanche, avec le développement de milieu de culture dépourvu de serum, des études ont pu mettre en évidence des composés extracellulaires modulant la différenciation adipocytaire.

a. Hormone de croissance et IGF-1

C'est en 1985 que Green H. et son équipe ont mis en évidence le rôle pro-adipogénique de l'hormone de croissance sur la différenciation des préadipocytes 3T3-F442A en adipocyte mature (Green et al., 1985). Les études qui ont suivi ont démontré que l'hormone de croissance était responsable de l'induction d'un autre facteur de croissance, IGF-1 (Insulin Growth Factor 1), impliqué dans la différenciation adipocytaire (Kamai et al., 1996).

IGF-1 est une hormone peptidique ayant une structure similaire à l'insuline. Il est maintenant admis que ces deux hormones induisent la différenciation adipocytaire (Schmidt et al., 1990). Les voies impliquées dans ce processus passent par une cascade de phosphorylation/déphosphorylation de facteurs intracellulaires. Ainsi, le récepteur à l'insuline ou à l'IGF-1 possède une activité tyrosine kinase déclenchant la phosphorylation de nombreux médiateurs intracellulaires et notamment la protéine Akt/PKB. Or cette protéine kinase a pour cible un facteur de transcription FoxO1 (Forkhead box class O1) connu pour son rôle dans l'activation de l'expression de PPAR γ (Czech, 2003; Nakae et al., 2003). La voie insulinique permet ainsi par l'intermédiaire de ces médiateurs intracellulaires d'induire l'expression de PPAR γ , acteur crucial dans le processus de différenciation adipocytaire.

b. Autres facteurs de croissance et cytokines

D'autres facteurs de croissance participent également à l'adipogénèse. Néanmoins, ces molécules ont essentiellement un rôle anti-adipogénique. Ainsi, les membres de la superfamille des TGF β ont été impliqués dans la modulation de l'adipogénèse. Cette famille de facteur de croissance est connue pour son rôle dans la régulation du devenir cellulaire dans de nombreux tissus. Dans le cas du TAB, l'Activine A, un membre de la superfamille des TGF β , est impliqué dans l'adipogénèse. L'expression de ce facteur de croissance très forte dans les précurseurs adipocytaires va diminuer au cours de la différenciation (Zaragosi et al., 2010). De plus, l'addition d'Activine A dans le milieu de culture de préadipocytes inhibe l'induction de l'adipogénèse (Zaragosi et al., 2010). Cette hormone régule donc de manière autocrine le processus de différenciation adipocytaire. Cependant, les préadipocytes ne sont pas les seuls producteurs d'Activine A. Les macrophages ont également la propriété de sécréter de cette hormone.

Différentes cytokines pro-inflammatoires, le TNF α , l'IFN γ et l'IL-1 β , possèdent également des activités anti-adipogéniques. Ainsi, la présence de TNF α dans le milieu de culture de préadipocytes 3T3-L1 inhibe leur conversion en adipocytes matures (Keay and Grossberg, 1980). L'effet de cette cytokine sur l'adipogénèse passe par une diminution de l'expression de PPAR γ et de son activité de liaison à ses sites spécifiques sur l'ADN diminuant par conséquent l'expression de C/EBP α et d'aP2.

c. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont une famille d'hormones libérées par les glandes surrénales en réponse à un stress aigu. Par conséquent, ces hormones participent entre autres à la régulation du métabolisme lipidique afin d'apporter rapidement des nutriments à l'organisme. Cette famille de molécules est notamment impliquée dans l'induction de la différenciation adipocytaire. Ainsi, *in vitro*, la conversion adipogénique de la majorité des préadipocytes murins et humains nécessite la présence d'un mix hormonal contenant entre autres la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse (Chapman et al., 1985). Le mode d'action des glucocorticoïdes passe par leur liaison et l'activation de leur récepteur, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Ce récepteur de la famille des récepteurs nucléaires va alors réguler la cascade transcriptionnelle impliquée dans l'adipogénèse (Pantoja et al., 2008). En effet, le GR participe à l'induction du facteur de transcription impliqué dans les premières étapes de

l'adipogénèse, le C/EBP δ (Pantoja et al., 2008). De plus, le gène-clé de l'adipogénèse codant pour le facteur de transcription PPAR γ possède dans son promoteur un domaine de liaison au GR et au C/EBP β . De ce fait, la coopération de ces deux facteurs de transcription en se fixant sur leur site cible induit l'expression de cette protéine cruciale dans le processus de l'adipogénèse (Steger et al., 2010).

3. L'adipogénèse au cours de l'obésité

Pendant longtemps, le dogme voulait que le nombre d'adipocytes chez un individu fût déterminé au cours de l'enfance et de l'adolescence et qu'il reste constant à l'âge adulte. En effet, différentes études avaient ainsi démontré que la perte de poids chez l'Humain sur plusieurs mois ou années réduisait le volume moyen adipocytaire sans que le nombre d'adipocyte ne soit modifié (Löfgren et al., 2005; Spalding et al., 2008). De manière similaire, la prise de poids était à l'origine d'une augmentation non pas du nombre d'adipocyte mais du volume adipocytaire (Salans et al., 1971). Ces données appuyèrent donc la théorie selon laquelle, les variations de poids étaient à l'origine essentiellement de la variation du volume adipocytaire et non pas de leur nombre.

Cependant, dans une étude publiée en 2010, Arner et son équipe ont démontré en utilisant la décroissance de la radioactivité dans une population exposée à des essais nucléaires que les adipocytes étaient des cellules dynamiques (Arner and Spalding, 2010). En effet, tous les 8 ans, 50% des adipocytes dans le TAsc humains sont remplacés par de nouveaux adipocytes matures (Spalding et al., 2008).

Ainsi, il est maintenant admis que l'expansion de la masse grasse au cours de l'obésité résulte d'une part de l'augmentation du volume adipocytaire (hypertrophie) et d'autre part du nombre d'adipocytes (hyperplasie). Néanmoins, l'hypertrophie est un processus caractéristique de la prise de masse grasse et survient dans les premières étapes de la mise en place de l'obésité. En revanche, l'hyperplasie semble un processus plus tardif et fortement associé à la sévérité de l'obésité (Hirsch and Batchelor, 1976). Ainsi les adipocytes auraient un volume limite de stockage des lipides et lorsque ce volume est atteint le nombre d'adipocyte augmenterait dans le TAB.

B. Le métabolisme adipocytaire

Les adipocytes sont le seul type cellulaire spécifiquement adapté dans le stockage des lipides sans que ceux-ci ne soient toxiques et ne compromettent son intégrité fonctionnelle. Pour cela, ces cellules possèdent toute la machinerie enzymatique nécessaire dans le stockage des lipides sous la forme de triglycérides (TG) en période d'apport alimentaire et dans la mobilisation de ces lipides en période de demande énergétique (Fonseca-Alaniz et al., 2007). Les triglycérides sont contenus dans une large Gouttelette Lipidique (GL) uniloculaire remplissant la quasi-totalité du cytoplasme de la cellule et dont la membrane est en contact étroit avec le RE et les mitochondries, lieux où les TG sont estérifiés. Le métabolisme adipocytaire est constitué de deux grandes phases dont la régulation dépend essentiellement des demandes énergétiques de l'organisme: une phase de stockage lipidique au cours de laquelle des TG sont synthétisés et stockés dans la GL et une phase de mobilisation de ces lipides apportant à l'organisme des nutriments sous forme d'Acide Gras Libres (AGL).

1. Synthèse des triglycérides et lipogénèse

La majeure partie des lipides stockés dans les adipocytes provient de l'alimentation. Néanmoins, les acides gras peuvent également être le produit d'une synthèse *de novo* à partir de glucose, la lipogénèse. Ce processus survient dans le foie et le TAB. Néanmoins, même si les adipocytes possèdent l'ensemble des enzymes clés impliquées dans ce processus, la contribution de ce type cellulaire dans la production d'AG à partir de glucose reste mineure contrairement aux cellules hépatiques (Björntorp and Sjöström, 1978; Sjöström, 1973).

Les chylomicrons et les VLDL sont les lipoprotéines responsables du transport dans la circulation sanguine des lipides ingérés ou provenant de la lipogénèse hépatique respectivement. De par leur taille volumineuse, ces lipoprotéines vont devoir être hydrolysées par une enzyme, la lipoprotéine lipase (LPL) en acide gras et 2-monoacylglycérol. Au niveau du TAB, la LPL est une enzyme exprimée et sécrétée par les adipocytes. Elle est transloquée dans la lumière des capillaires afin d'être mis en contact direct avec les lipoprotéines de transport (chylomycron et VLDL).

Les produits d'hydrolyse de la LPL vont alors pénétrer dans l'adipocyte grâce à des transporteurs spécifiques exprimés par ce type cellulaire: la FATP (Fatty Acid Transporter Protein) (Schaffer and Lodish, 1994), le CD36 (Abumrad et al., 1993) et la FABPpm (Fatty Acid Binding Protéin of the plasma membrane) (Isola et al., 1995). Une fois dans le cytoplasme des adipocytes, ces molécules lipophiles vont être prises en charge par une protéine de transport dédiée, la FABPs (Fatty Acid Binding Protein).

Le passage des AGL de l'espace extracellulaire dans la cellule induit parallèlement leur activation en acyl-coA, une étape cruciale pour l'estérification de ces molécules en TG. En effet, la protéine de transport FATP possède la propriété catalytique acyl-coA synthetase permettant l'activation des AGs en acyl-coA (Pohl et al., 2004).

La synthèse d'une molécule de TG requiert également du glycérol-3-phosphate. Ce dernier provient soit de la glycolyse soit de la néoglucogénogénèse et est donc un produit du métabolisme du glucose dans l'adipocyte (Reshef et al., 2003). Ce dernier pénètre dans les adipocytes par l'intermédiaire des transporteurs au glucose, Glut-1 et Glut-4.

Dans l'adipocyte, la biosynthèse des TG est le résultat d'une succession de réaction d'estérification au niveau des trois fonctions alcooliques du glycérol-3-phosphate catalysées par différentes enzymes consécutives (Figure 9) : la Glycérol-3-Phosphate acyltransférase (GPAT) (Bell and Coleman, 1980), la 1-acylglycérol-3-phosphate (AGPAT) (Leung, 2001) et les diacylglycérol transférases (DGAT) (Cases et al., 1998, 2001). Toutes ces enzymes possèdent plusieurs isoformes distinctes. Dans le TAB, les isoformes GAP1, GAP2, AGAP2, DGAT1 et DGAT2 ont été identifiées et sont les plus abondamment exprimées (Agarwal and Garg, 2003).

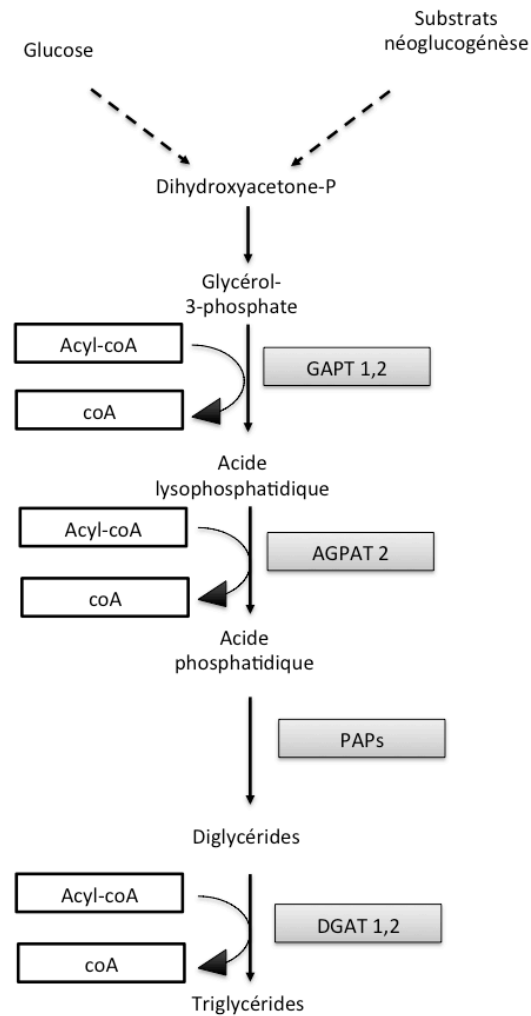


Figure 9: Voie de la synthèse des triglycérides dans l'adipocyte (adapté de V. Large)

GAP1 : glycérol-3-phosphate acyl transférase ; AGPAT : 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase ;
 PAP : phosphatidase phosphohydrolase ; DGAT : Diacylglycérol acyltransférase

Les TG ainsi synthétisés vont alors être stockés au sein de la GL de l'adipocyte dans l'attente d'être mobilisés en période de demande énergétique.

2. Mobilisation des triglycérides : lipolyse

En période de jeûne et d'exercice physique lorsque toutes les réserves en glycogènes sont épuisées et que les tissus périphériques nécessitent de l'énergie, les TG stockés dans les adipocytes sont hydrolysés par un processus, la lipolyse, libérant des acides gras libres (AGL) dans la circulation. Ces nutriments peuvent ainsi être délivrés aux tissus périphériques servant de substrat pour la β -oxydation et produisant de l'ATP. Seuls les adipocytes possèdent la propriété de libérer des AGL dans la circulation (Kolditz and Langin, 2010).

La lipolyse est une hydrolyse séquentielle d'une molécule de TG en trois molécules d'acide gras et une molécule de glycérol par une classe d'enzymes hydrolytiques appelé les lipases. Chez les mammifères, trois lipases catalysent séquentiellement la libération d'une molécule d'acide gras à chaque étape (Figure 10). Ainsi, par ordre d'apparition au cours de l'hydrolyse de la molécule de TG, l'Adipose TG Lipase (ATGL), l'Hormono-sensible Lipase (HSL) et la MonoGlycéride Lipase (MGL) vont être transloquées au niveau de la GL et vont alors hydrolyser chacune à leur tour leur substrat d'intérêt (Figure 10):

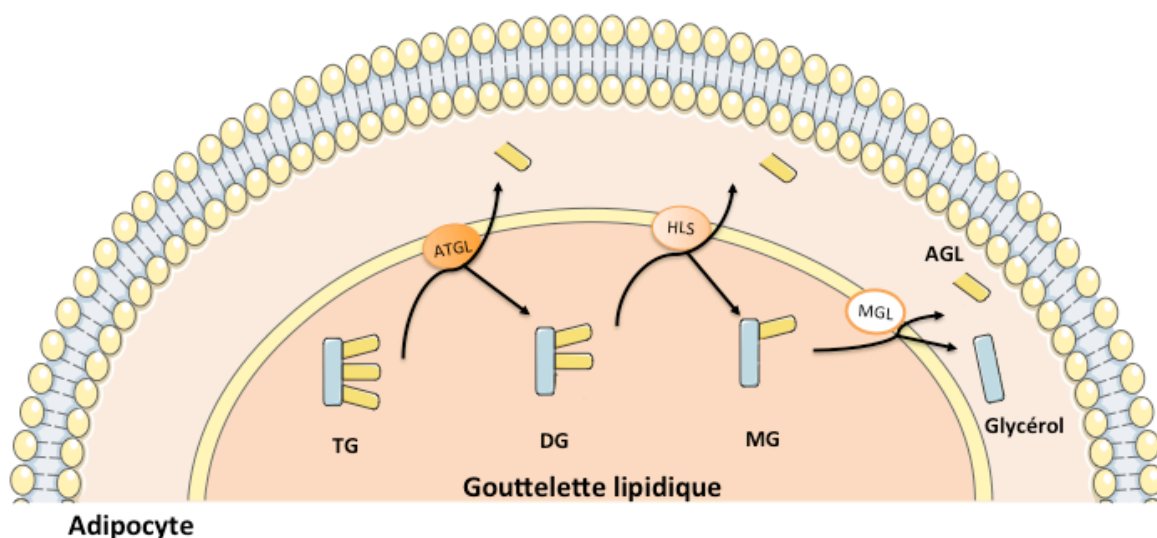


Figure 10: Cascade lipolytique dans l'adipocyte

ATGL : Adipose Triglyceride Lipase ; HSL : Hormono-sensible lipase ; MGL : Monoglyceride Lipase

TG : Triglycérides ; DG : Diglycérides ; MG : Monoglycerides ; AGL : Acides Gras Libres

L'apport en nutriments devant être étroitement contrôlé en fonction de la demande et de l'environnement, la lipolyse est par conséquent un processus sous la dépendance de nombreux facteurs. Les catécholamines, les peptides natriurétiques et l'insuline sont les régulateurs majeurs de la lipolyse (Figure 11).

➤ Les catécholamines

Les catécholamines et particulièrement les hormones du stress, l'Adrénaline et la Noradrénaline, sont des médiateurs majeurs de la lipolyse. Elles possèdent à la fois la capacité d'induire et d'inhiber la mobilisation des lipides. Ces propriétés antagonistes dépendent de l'affinité à un temps t de ces molécules pour différents sous-types de récepteurs adrénergiques. Ainsi, l'induction de la lipolyse passe par la fixation des catécholamines aux récepteurs β -adrénergiques alors que l'inhibition de la mobilisation des lipides est transmise par le récepteur α_2 -adrénergique (Robidoux et al., 2004).

Les récepteurs β -adrénergiques sont associés dans la membrane de la cellule à la protéine G stimulatrice la sous-unité G_s (Lafontan and Berlan, 2003). La stimulation de ce sous-type de récepteur induit une cascade de phosphorylation activant *in fine* la Protéine Kinase A (PKA). Cette dernière va alors phosphoryler la périlipine, une protéine associée à la GL, et la HSL, enzyme impliquée dans la seconde étape de la lipolyse (Garton et al., 1988; Strålfors et al., 1984). La phosphorylation de la périlipine permet alors le recrutement d'un co-activateur de l'ATGL, le « comparative gene identification-58 » (CGI-58) au niveau de la GL. Cette protéine facilite l'activation de l'ATGL, l'enzyme initiant la cascade lipolytique (Lass et al., 2006; Subramanian et al., 2004). L'étape de phosphorylation de la HSL permet son activation rapide et sa translocation du cytosol à la GL, étape cruciale pour l'hydrolyse des DG (Egan et al., 1992).

Par opposition, le récepteur α_2 -adrénergique est quant à lui associé à la protéine G inhibitrice, G_i , dont l'action est comme son nom l'indique d'inhiber l'adénylate cyclase et par conséquent la phosphorylation de la périlipine et de l'HSL (Lafontan and Berlan, 2003).

➤ Les peptides natriurétiques

Les hormones cardiaques Atrial Natriuretic Peptide (ANP) et B-type Natriuretic peptide (BNP) sont également des régulateurs positifs majeurs de la lipolyse. Ces molécules sont libérées dans la circulation au niveau des oreillettes ou des ventricules à la suite d'une dystension des myotubes (Clerico et al., 2011). Les récepteurs aux peptides natriurétiques présents au niveau des adipocytes activent comme les récepteurs adrénergiques à la suite d'une cascade de phosphorylation la PKA ou la PKG (Protéine Kinase G). Ces enzymes vont comme alors phosphoryler la perilipine et l'HSL modulant ainsi la cascade lipolytique (Sengenès et al., 2005).

➤ L'insuline

L'insuline représente le facteur anti-lipolytique majeur (Jensen and Nielsen, 2007). Le récepteur à l'insuline possède une activité tyrosine kinase à l'origine d'une cascade de phosphorylation activant une enzyme la Phosphodiesterase 3B (PDE3B) qui catalyse la dégradation de l'AMPc en 5'-AMP et par conséquent, module négativement la PKA (Choi et al., 2006). L'inactivation de cette enzyme réduit ainsi fortement la phosphorylation de la perilipine et l'HSL supprimant la lipolyse.

En plus de ces acteurs majeurs de la régulation de la lipolyse, il existe un grand nombre de facteurs régulant le processus de mobilisation des lipides dans le TAB.

C'est le cas par exemple du $\text{TNF}\alpha$ qui par l'intermédiaire de son $\text{TNF}\alpha$ récepteur active la voie des MAPKs (p42/44 ; JNK et p38) qui sont des inducteurs de la lipolyse (Ryden et al., 2002). De plus dans des adipocytes humains, le $\text{TNF}\alpha$ diminue significativement l'expression de la protéine PD3B (Zhang et al., 2002). Par conséquent, cette cytokine module positivement la lipolyse dans les adipocytes.

En conclusion, la mobilisation des lipides ou lipolyse est un processus complexe nécessitant une cascade d'enzymes permettant séquentiellement de libérer des AGL et du glycérol pouvant être utilisés par l'organisme comme substrat énergétique.

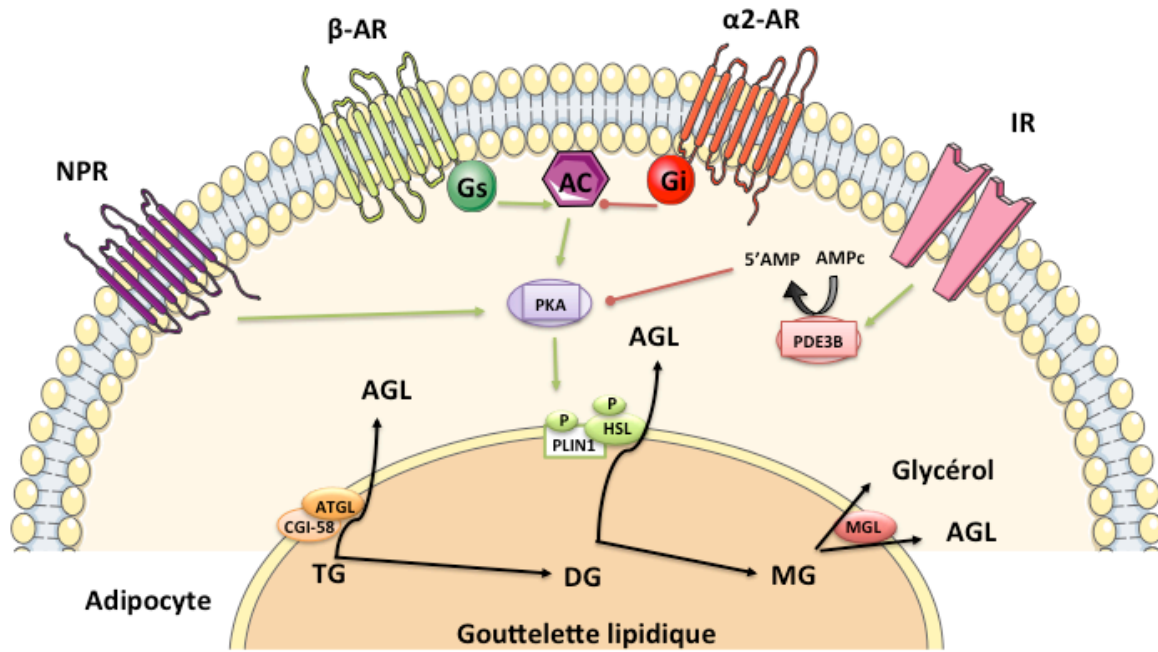


Figure 11: Régulation de la lipolyse dans l'adipocyte (adapté de J.M. Rutkowski)

NPR : Natriurétique Peptide Receptor ; AR : Adrénergique Récepteur ; AC : Adénylate cyclase ; PKA : Protéine Kinase A ; PD3B : Phosphodiesterase 3B ; ATGL : Adipose Triglyceride Lipase ; HLS : Hormono-sensitive lipase ; PLIN1 : perilipine ; MGL : Monoglyceride Lipase ; AC : Adénylate cyclase ; TG : Triglycérides ; DG : Diglycérides ; MG : Monoglycerides ; AG : Acides Gras Libres

IV. La Matrice Extracellulaire du Tissu Adipeux Blanc: structure, dynamique et physiopathologie

La Matrice Extracellulaire (MEC) est composée d'un ensemble de macromolécules formant un réseau tridimensionnel complexe à l'origine du compartiment non-cellulaire des tissus. Cette structure supramoléculaire a été pendant longtemps considérée comme inerte, remplissant l'espace extracellulaire et apportant un support architectural et une résistance mécanique aux tissus. Puis, il a été mis en évidence que la MEC est une structure dynamique en relation étroite avec les cellules leur apportant des signaux spécifiques via des récepteurs et régulant leur comportement face à leur environnement.

Ainsi, la distribution et l'organisation des composés de la MEC dans l'espace sont des processus spécifiques à chaque tissu et extrêmement régulés permettant de conserver l'intégrité architecturale du tissu et son homéostasie. Par conséquent, la moindre modification ou altération de la MEC peut compromettre la structure et l'activité biologique du tissu menant au développement d'une pathologie.

Or, il est maintenant admis qu'au cours de l'obésité, la MEC du TAB subit un remaniement massif aboutissant à la formation de fibrose. Ce processus est étroitement associé à l'état inflammatoire chronique caractéristique du TAB obèse ainsi qu'aux complications métaboliques. Dans la revue « Fibrosis as a cause or a consequence of white adipose tissue inflammation in obesity » (cf Annexe), après avoir décrit la MEC du TAB dans les conditions physiologiques puis pathologiques, nous présentons deux hypothèses explorant la cinétique des événements reliant l'inflammation, la fibrose et les complications métaboliques à partir de l'état des connaissances actuelles.

A. Les composés de la MEC : le « Matrisome » (Hynes and Naba, 2012)

L'analyse précise des composants de la MEC et le séquençage des génomes d'un grand nombre d'organismes ont permis d'identifier l'ensemble des protéines de la MEC appelé le « matrisome » (Hynes and Naba, 2012). Chez les mammifères, environ 300 protéines ont ainsi été décrites représentant 1 à 1,5% de l'ensemble du protéome (Hynes and Naba, 2012).

Classiquement, le « matrisome » est divisé en deux grandes catégories : les protéines fibrillaires et les protéines non-fibrillaires (Järveläinen et al., 2009; Schaefer and Schaefer, 2010). Dans la première catégorie sont retrouvés les collagènes ainsi que les fibres élastiques. Les protéoglycanes et les glycoprotéines appartiennent quant à elles à la famille des protéines non-fibrillaires. Plus récemment, des études ont mis en évidence une autre catégorie de protéines cruciales pour la stabilité de la MEC, les protéines matricielles.

1. Les collagènes (Ricard-Blum, 2011)

La superfamille des collagènes englobe l'une des familles de protéines les plus abondantes (30% de la masse totale des protéines) et complexes du règne animal. Ces protéines à haut poids moléculaire constituent les éléments majeurs de la MEC et apportent une stabilité structurelle aux tissus. A ce jour, 28 types de collagènes différents ont été décrits chez les mammifères (noté en chiffre romain de I à XXVIII). L'organisation de ces molécules en une structure supramoléculaire dans l'espace extracellulaire est un processus soigneusement conçu et adapté à l'activité biologique du tissu d'intérêt. Par conséquent, la composition et l'organisation des collagènes sont propres à chaque tissu et cruciales pour le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de la MEC.

a. Structure et synthèse des collagènes (Figure 12)

Les collagènes contiennent trois domaines distincts : un domaine majeur en triple hélice et deux domaines globulaires situés en position N et C terminale. La protéine finale résulte de l'association de trois chaînes polypeptidiques α , s'enroulant entre elles et formant la structure caractéristique en triple hélice. Les chaînes α se distinguent par la répétition de la séquence Gly-X-Y riche en hydroxyproline et hydroxylysine (Prockop and Kivirikko, 1995; Ramachandran, 1988). Chaque chaîne α est le produit d'un gène distinct et est à l'origine d'un type particulier de collagène (Tableau 3). Chez les

vertébrés, 43 gènes ont été identifiés codant pour différentes chaînes α . Dans leur dénomination, il est par conséquent nécessaire de préciser à la fois numéro de la chaîne α et le type de collagène dont il est fait référence. De ce fait, le gène codant pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène 1 est annoté de la manière suivante : *COL1A1*.

Les chaînes α des collagènes sont traduites en précurseurs à haut poids moléculaires, appelés pré-pro-chaîne α . Ainsi, associé au peptide signal (la région « pré ») requis pour le transport vers le réticulum endoplasmique (RE), chaque chaîne α présente une extension peptidique (la région « pro ») située en position N et C terminale. Celle-ci est nécessaire pour la formation correcte de la triple hélice et subsiste tout au long de la voie de sécrétion.

Les chaînes α ainsi formées vont subir différentes modifications post-traductionnelles dans la lumière du RE, notamment deux étapes d'hydroxylation sur les résidus lysine et proline située en position Y du triplet.

La formation d'hydroxylysine est catalysée par les lysyl-hydroylases (LH) appartenant à la famille des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendante (Myllylä et al., 2007). Trois isoformes (LH1, LH2 et LH3) possédant une activité LH ont été caractérisées (Armstrong and Last, 1995; Mercer et al., 2003). Ces isoformes n'ont pas de spécificité à proprement parler mais ont une préférence pour certaines séquences (Risteli et al., 2004).

Les résidus hydroxylysines peuvent par la suite être de nouveau modifiés par d'autres enzymes (galactosyl transferase et galactosylhydroxylysyl-glycosyl transferase) en galactosylhydroxylysine ou en glucosylgalactosylhydroxylysine (Kivirikko and Myllylä, 1979). Le rôle précis de l'addition de ces groupements glucidiques sur les résidus hydroxylysine n'est pas encore clairement élucidé. En revanche, il a été démontré que les résidus hydroxylysine non modifiés possèdent un rôle important dans la stabilisation de la réticulation des molécules de collagènes entre elles ayant lieu dans l'espace extracellulaire après sécrétion. L'hydroxylation des résidus lysine gouverne donc la nature des liaisons créées entre les molécules de collagènes et par conséquent les propriétés biomécaniques du tissu (Banse et al., 2002; Kivirikko and Myllylä, 1979; Knott and Bailey, 1998; Reiser et al., 1992). Ainsi, le degré d'hydroxylation des résidus lysine dans la triple hélice varie selon le type de collagène

et son assemblage dans l'espace extracellulaire comme décrit dans le chapitre suivant. Les collagènes de type IV et VI par exemple présentent le taux le plus élevé de résidus hydroxylysine alors que les collagènes de type I et III ont le taux le plus faible.

La seconde modification post-traductionnelle cruciale survenant sur les chaînes α des collagènes est l'hydroxylation des résidus proline en position Y. Cette réaction est catalysée par les prolyl-4-hydroxylases (P4H) dont l'activité nécessite la présence de Fe^{2+} , de 2-oxoglutarate, d' O_2 et d'ascorbate. L'addition d'un groupement hydroxyl sur des résidus proline est essentielle pour la stabilité thermique de la triple hélice des collagènes. En effet, lorsque l'activité de la P4H est déficiente dans le cas du scorbut par exemple (carence en ascorbate), la formation et la stabilisation de la triple hélice est affectée. Ainsi, les procollagènes traduits mais non hydroxylés restent associés à la P4H et sont alors séquestrés dans le RE (Juva et al., 1966; Kao et al., 1979; Walmsley et al., 1999). Du fait de l'instabilité des chaînes pro- α , la peau et les vaisseaux sanguins deviennent alors extrêmement fragiles (Mussini et al., 1967; Szarka and Lőrincz, 2014).

Chaque chaîne α s'associe ensuite avec deux autres chaînes formant la triple hélice. L'assemblage de ces polypeptides entre eux n'est pas anodin. En effet, la formation de la molécule de collagène implique une étape cruciale de reconnaissance entre trois chaînes α de manière spécifique dans le but de s'assembler et de former une suprastructure en lien avec le type de collagène (Ricard-Blum, 2011; Yurchenco, 2011). Néanmoins, les mécanismes de reconnaissance entre chaînes α restent encore assez peu décrits. Par ailleurs, quelques études ont mis en évidence que dans le cas de certains collagènes, notamment le collagène I et III, le domaine globulaire situé en position C terminale est essentiel dans cette étape de trimérisation (Doege and Fessler, 1986; Fessler and Fessler, 1974). Selon le type de collagène, l'association peut être à l'origine de la formation d'homotrimère ou d'hétérotrimère, lorsque les trois chaînes α formant la triple hélice sont différentes (tableau 3).

Enfin, de nombreuses études ont mis en évidence une protéine chaperonne située dans le RE (Saga et al., 1987) spécifiquement dédiée aux collagènes, la protéine HSP47 (Heat-Shock-Protein 47) (Nakai et al., 1992; Saga et al., 1987). L'absence de cette protéine dans des fibroblastes altère la formation de la triple hélice. Ce mauvais repliement des collagènes inhibe par conséquent leur sécrétion dans

l'espace extracellulaire et est à l'origine d'une accumulation non physiologique des procollagènes dans le RE (Ishida et al., 2006; Thomson and Ananthanarayanan, 2000). HSP-47 est une protéine nécessaire pour la maturation des procollagènes facilitant le passage en direction du compartiment *cis*-Golgi en vue de leur sécrétion dans l'espace extracellulaire (Bonfanti et al., 1998; Satoh et al., 1996).

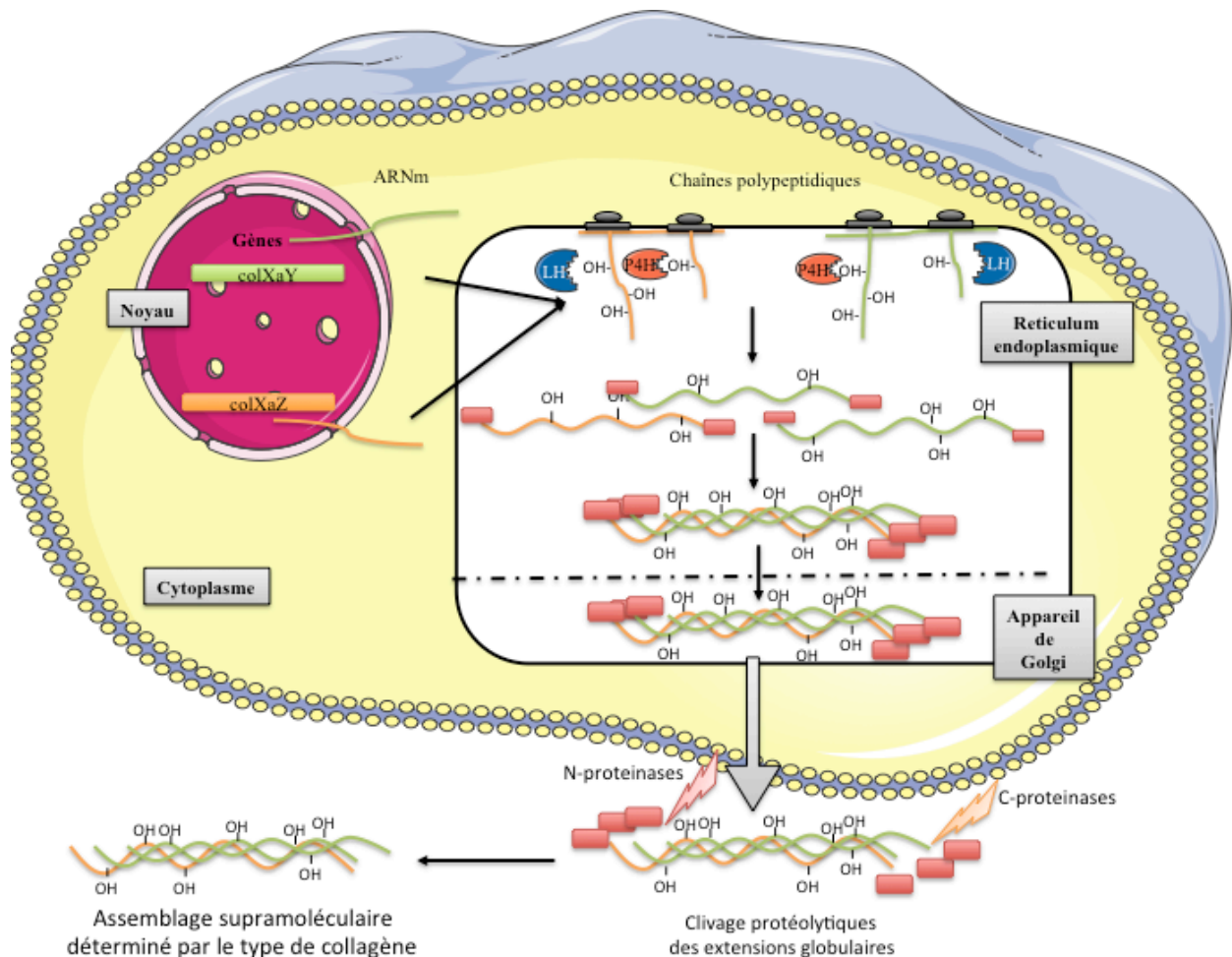


Figure 12: Les événements intra- et extra-cellulaires menant à l'organisation supramoléculaire des collagènes

Après avoir été transcrits, les ARNm sont traduits en pro-chaînes α polypeptidiques hydroxylées par des lysines hydroxylases (LH) ou des prolyl-4-hydroxylases (P4H) dans le réticulum endoplasmique. Ces pro-chaînes α vont alors s'associer pour former un trimère qui va alors être sécrété dans l'espace extracellulaire. Dans cet espace, les domaines globulaires en position N- et C-terminaux vont être clivés par des N-protéinases (ADAMTS-2 ; -3 ; -14) et des C-protéinases (BMP-1 ; mTLD ; TLL-1). Le trimère mature ainsi formé va alors pouvoir s'organiser en une structure supramoléculaire propre à chaque type de collagènes.

b. Assemblage des collagènes et classification

Les procollagènes sécrétés dans l'espace extracellulaire doivent alors subir un clivage protéolytique de leurs extensions globulaires en position N et C terminal (Figure 12). Ce clivage est nécessaire pour que les protéines soient entièrement matures et fonctionnelles (Hulmes, 2002; Kadler et al., 1987). Les enzymes qui catalysent cette réaction ont été mises en évidence dans le milieu extracellulaire de cellules *in vitro* (Jimenez et al., 1971; Kerwar et al., 1973; Layman and Ross, 1973). D'une part, les membres de la famille des tolloïdes des métalloprotéinases de zinc dans laquelle on trouve les BMP-1 (Bone morphometric protéin-1), les mammalian tolloïd (mTLD) et les tolloïd like 1 (TLL-1) et connus pour leur activité C-protéinases participent alors au clivage du domaine globulaire en position C-terminale (Hartigan et al., 2003; Kessler et al., 1996). D'autre part, ce sont les membres de la famille des ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase Thrombospondin motif), et notamment l'ADAMTS-2, l'ADAMTS-3 et l'ADAMTS-14, qui possèdent une activité N-protéinase (Colige et al., 1997, 2002; Fernandes et al., 2001).

Cette étape est cruciale dans la formation des structures supramoléculaires en convertissant les molécules de procollagènes en molécules de collagènes. Ce sont ces dernières qui sont alors aptes à s'auto-assembler formant dans l'espace extracellulaire des structures polymériques contribuant à l'organisation ultrastructurale de la MEC d'un tissu (Goldberg and Sherr, 1973). La structure et l'organisation supramoléculaire des collagènes sont variables et dépendent du type de collagènes. En effet, l'auto-assemblage de ces protéines entre elles dépend en grande partie de la répartition et de la longueur du domaine en triple hélice, structure relativement rigide. Compte tenu de cette identité ultrastructurale, la superfamille des collagènes est alors divisée en six sous-familles classées en fonction de leur organisation supramoléculaire (Tableau 3).


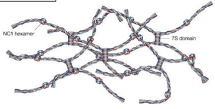
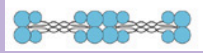
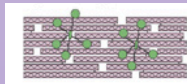
Sous-famille	Type	Gènes	Composition moléculaire	Distribution
Collagènes Fibrillaires (Bateman J) 	I III II V XI	Col1a1 Col1a2 Col3a1 Col2a1 Col5a1 Col5a2 Col5a3 Col11a1 Col11a2 Col11a3	$(\alpha_1(I))_2 \alpha_2(I)$ $(\alpha_1(III))_3$ $(\alpha_1(II))_3$ $\alpha_1(V) \alpha_2(V) \alpha_3(V)$ $\alpha_1(XI) \alpha_2(XI) \alpha_3(XI)$	Matrice interstitielle
Collagènes s'associant en réseau (R. Kalluri) 	IV	Col4a1 Col4a2 Col4a3 Col4a4 Col4a5 Col4a6	$(\alpha_1(IV))_2 \alpha_2(IV)$ $(\alpha_3(IV))_2 \alpha_4(IV)$ $\alpha_4(IV) \alpha_5(IV) \alpha_6(IV)$	Membrane basale
Collagènes en filament perlé 	VI	Col6a1 Col6a2 Col6a3	$\alpha_1(VI) \alpha_2(VI) \alpha_3(VI)$	Interface matrice interstitielle et membrane basale
Multiplexines	XVIII	Col18a1	$(\alpha_1(XVIII))_3$	Membrane basale
FACIT 	XII XIV XIX XX XXI	Col12a1 Col14a1 Col19a1 Col20a1 Col21a1	$(\alpha_1(XII))_3$ $(\alpha_1(XIV))_3$ $(\alpha_1(XIX))_3$ $(\alpha_1(XX))_3$ $(\alpha_1(XXI))_3$	Matrice interstitielle associée aux collagènes fibrillaires (non observé dans le TAB)
Collagènes transmembranaires	XIII XVII	Col13a1 col17a1	$(\alpha_1(XIII))_3$ $(\alpha_1(XVII))_3$	Membrane plasmique des cellules ou forme soluble

Tableau 3: Classification en sous-familles des différents types de collagènes (d'après Gelse; Ricard-Blum)

Les collagènes signalés en gras ont été mis en évidence dans le TAB

➤ Les collagènes fibrillaires (collagènes I, II, III, V et XI)

Les collagènes fibrillaires sont les collagènes les plus abondants et largement distribués dans l'organisme. Cette sous-famille également appelée « collagènes classiques » du fait de leur structure standard présente un domaine en triple hélice contenant la séquence répétée Gly-X-Y. Une fois excrétées dans l'espace extracellulaire, ces protéines ont la propriété de s'agréger en une structure fibrillaire extrêmement bien ordonnée. Les fibrilles formées se présentent le plus souvent sous une forme hétérotypique c'est à dire qu'elles sont le résultat de l'association de différents types de

collagènes fibrillaires stabilisés entre eux par des liaisons covalentes. En microscopie électronique à transmission (MET), les fibrilles de collagènes formées sont visualisables sous la forme d'une alternance de bandes claires et de bandes sombres, transversales à l'axe de la fibre (Figure 13). Le motif en bande présente une périodicité axiale le long de la fibrille définie comme la période D de 67 nm. Ce phénomène de périodicité est expliqué par la présence de trous (« gap ») de 47 nm entre les molécules de collagènes successives (Figure 13) (Hodge A.J and Petruska JA). Chacune des molécules de collagènes formant la fibrille présente un décalage les unes par rapport aux autres d'une longueur de 67 nm (Contard et al., 1993). Avec la présence d'un domaine en triple hélice, structure rigide, répartie sur toute la longueur et de par leur organisation en fibrille, le rôle majeur de ces collagènes fibrillaires est mécanique apportant aux tissus une résistance aux tensions (Parry, 1988).

Le collagène fibrillaire de type I est le plus abondant des collagènes. Il est le plus souvent incorporé dans un réseau fibrillaire hétérotypique contenant notamment un autre collagène fibrillaire le collagène de type III (Fleischmajer et al., 1990). L'assemblage et la réticulation de ces deux types de collagènes forment des fibrilles extrêmement résistantes aux enzymes protéolytiques et possédant des propriétés physiques de résistance aux tensions (Reiser et al., 1992). L'association forte entre les collagènes de type I et de type III est due à l'action d'une famille d'enzyme les lysyl oxydases (LOX). Ces protéines catalysent une réaction d'oxydation des groupes amines des résidus lysines ou hydroxylysines formant ainsi des aldéhydes. Ces groupements présents au niveau de deux chaînes polypeptidiques distincts vont alors spontanément s'associer pour former une liaison forte (Kagan and Trackman, 1991). Ce type de liaison covalente se créant entre les collagènes de type I et de type III établit des fibres réticulaires conférant aux tissus des propriétés structurales et de résistance aux tensions. Ce type de réseau fibrillaire est retrouvé dans la matrice interstitielle de nombreux tissus et notamment dans le Tissu Adipeux Blanc (Cryer and Van, 1982; Fleischmajer et al., 1978; von der Mark, 1981).

➤ Les collagènes formant des réseaux (collagènes IV, VIII et X)

Ce sous-type de collagène a la particularité contrairement aux collagènes fibrillaires de posséder un large domaine en triple hélice fréquemment interrompu par de courte séquence non-collagène (différentes de Gly-X-Y). Cette triple hélice discontinue leur apporte une flexibilité favorisant leur

association avec d'autres protéines et la formation de réseau. Ces collagènes sont les constituants majoritaires de fins réseaux architecturaux présents dans la MEC des tissus. De ce fait, le collagène IV qui sera décrit ultérieurement dans le chapitre IV B.1.a, est le composant majoritaire des Membranes Basales notamment retrouvées dans le TAB. Deux autres types de collagènes formant cette sous-famille, les collagènes VIII et X, vont quant à eux être respectivement à la base de l'architecture de la Membrane de Descemet présente dans l'œil et d'une structure assimilable retrouvée dans le cartilage (Kwan et al., 1991; Oakley et al., 2004). Leur association en réseau, amplement décrite dans la partie sur le collagène IV, se fait au niveau des deux domaines globulaires non-collagènes situés en positions N (domaine 7S) et C terminale (domaine NC1) (Yurchenco and Schittny, 1990) (Figure13).

➤ Les filaments perlés (collagènes VI, VII, XXVI, XXXVIII)

Parmi les collagènes à l'origine de la formation de filaments perlés ou de fibrilles d'ancrage (Aumailley et al., 1991; Burgeson, 1993), le collagène VI est l'un des mieux caractérisés et le plus représenté (Bruns et al., 1986). Celui-ci est caractérisé par deux larges domaines globulaires en position N et C terminale séparé au centre par un court segment en triple hélice (Hessle and Engvall, 1984). Comme beaucoup d'autres collagènes non-fibrillaires, le domaine en triple hélice est interrompu par de courtes séquences non-collagène leur permettant d'interagir directement avec d'autres protéines de la MEC comme la fibronectine, le collagène de type I (McDevitt et al., 1991) ou des récepteurs cellulaires comme les intégrines (Doane et al., 1992; Pfaff et al., 1993). L'organisation en filaments perlés résulte d'une dimérisation anti-parallèle entre deux molécules (Engel et al., 1985) (Figure 13). Ces dimères s'alignent alors parallèlement en tétramères. Ces derniers vont enfin s'agréger sous la forme d'un filament (Figure 13) (Maynes, 2012). Ces microfilaments formés s'orientent dans l'espace extracellulaire perpendiculairement aux collagènes fibrillaires et fibres élastiques (Reise et al., 1992). Ils sont par conséquent en relation étroite avec la Membrane Basale des tissus (Kuo et al., 1997). Cette organisation ultrastructurale suggère que les collagènes formant des filaments perlés peuvent être considéré comme des molécules à l'interface entre la matrice environnante formée des collagènes fibrillaires et les cellules entourées de leur Membrane Basale (Aumailley et al., 1991; Timpl, 1996). Ce critère est d'autant plus important que dans notre cas le

collagène VI, molécule très décrite dans le TAB, participe à l'architecture et par conséquent à la stabilité de ce tissu (Khan et al., 2009; Park and Scherer, 2012).


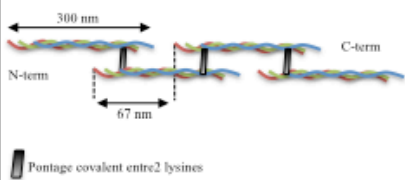
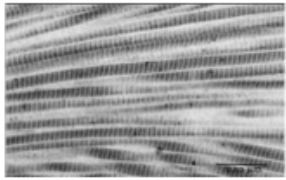

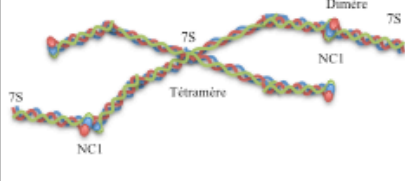
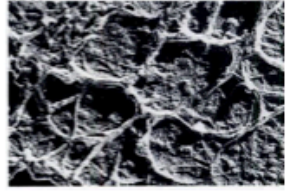

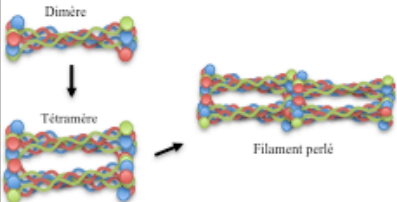

Molécules	Représentation schématique de l'ultrastructure	Observation en Microscopie électronique
Collagènes fibrillaires: procollagènes I, III 		
Collagènes formant des réseaux: procollagènes IV 		
Collagènes formant des filaments perlés: Procollagènes VI 		

Figure 13: Structure moléculaire et assemblage supramoléculaire des collagènes présents dans le TAB
 (d'après Van Der Rest and Garrone)

➤ Les multiplexin (multiple triple-helix domains with interruptions : collagènes XV et XVIII)

Ces collagènes possèdent à la fois les propriétés structurales des collagènes et des protéoglycanes (Halfter et al., 1998; Oh et al., 1994). Cette caractéristique peu commune est le résultat comme leur nom l'indique de la présence de multiples domaines en triple hélice interrompus par des séquences non-collagènes (9 pour le collagène XV et 10 pour le collagène XVIII). De plus, ces molécules sont formées dans leur position N terminale de sites de liaisons à des chaînes héparanes sulfates, un type de glycosaminoglycanes, les classant dans la famille des protéoglycanes (Dong et al., 2003). La présence dans leur domaine C terminal d'un peptide nommé l'endostatine se retrouvant sous une forme soluble une fois clivé donne à cette sous-famille de collagène une fonction biologique anti-angiogénique et anti-tumorale (Davis et al., 2000; Marneros and Olsen, 2005; Ortega and Werb, 2002; Ricard-Blum, 2011). La localisation précise des collagènes XV et XVIII a permis de les mettre en

évidence dans la membrane basale des cellules épithéliales et des cellules endothéliales (Myers et al., 1996; Zaferani et al., 2014). Ceci explique que les multiplexines, et notamment le collagène XVIII soient impliqués dans le développement du système vasculaire. En effet, la délétion de ce type de collagène chez des souris entraîne entre autres un défaut de formation des vaisseaux sanguins au niveau de la rétine (Fukai et al., 2002; Ylikärppä et al., 2003). De plus, ces souris invalidées pour le collagène XVIII présentent une hypertriglycémie. Ce phénomène est retrouvé chez des sujets atteints du syndrome de Knobloch dont l'origine provient d'une mutation désactivante du gène COL18a1 (Bishop et al., 2010). A partir de ce constat, la présence de ce type de collagène a été mise en évidence dans le TAB murin (Aikio et al., 2014). Des études de délétion totale ont ainsi démontré que d'une part le collagène XVIII régula le métabolisme lipidique (Bishop et al., 2010) et d'autre part que celui-ci modulait l'expansion du TAB en participant au contrôle du programme adipogénique (Aikio et al., 2014). Par conséquent, une détérioration dans la structure du collagène XVIII dans le TAB peut avoir des conséquences physiopathologiques favorisant notamment la formation de dépôts adipeux ectopiques (Aikio et al., 2014).

➤ Les FACITs (associées aux collagènes fibrillaires : type IX, XII, et XIV)

Cette sous-famille de collagènes est caractérisée par un court domaine en triple hélice interrompu par de petites séquences non-collagènes (Mayne and Brewton, 1993). De par leur structure, ces molécules s'associent par des liaisons covalentes dans leur domaine en triple hélice aux collagènes fibrillaires retrouvés dans la matrice environnante stabilisant les fibres en formation. La présence de FACITs dans le TAB reste encore à démontrer.

➤ Les collagènes transmembranaires (collagènes XIII ; XVII ; XXIII et XXV)(Franzke et al., 2005)

Ce dernier sous-type de collagènes appartient à la famille des protéines transmembranaires de type II. Cela signifie que ces molécules possèdent un domaine N terminal intracellulaire, un seul passage transmembranaire hydrophobe et plusieurs domaines collagènes extracellulaires de longueurs variables. Des protéines membranaires présentant un domaine collagène-like que sont l'ectodysplasine, les « macrophage receptor with collagenous structure » (MARCO) et les « macrophage scavenger

receptors » ont été associé à cette sous-famille de collagène (Tenner, 1999). Ces protéines ne possèdent aucune fonction structurale mais interviennent dans le système immunitaire.

Les collagènes transmembranaires possèdent également une fonction de récepteur cellulaire. A la suite d'un clivage protéolytique, ils peuvent se trouver sous une forme soluble qui va alors pouvoir s'associer à d'autres composés de la MEC tels que la fibronectine, le nidogène-2, le perlecan, l'héparine et les intégrines (Tu et al., 2002). Ce phénomène permet de réguler les comportements cellulaires telles que la mobilité ou l'adhésion (Franzke et al., 2002; Tasanen et al., 2000). A l'heure actuelle, aucun de ces sous-types de collagènes n'a été mis en évidence dans le TAB.

2. Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont des constituants insolubles de la MEC. Ces éléments apportent aux tissus conjonctifs une résilience leur permettant une déformabilité à long terme et un retour passif à leur forme initiale. Ces propriétés élastiques sont complémentaires de celles des collagènes dont le rôle est d'apporter une résistance à la tension. Les fibres élastiques comprennent une couche externe microfibrillaire et un noyau interne amorphe d'élastine réticulée.

La première étape dans l'assemblage des fibres élastiques est la formation des microfibrilles dans l'espace extracellulaire. Par la suite, l'élastine sécrétée va être collectée sous la forme de petits agrégats au niveau des faisceaux de microfibrilles formées pour fusionner et former la fibre élastique mature (Wagenseil and Mecham, 2007). Les microfibrilles apportent un support architectural aux molécules d'élastine facilitant leur alignement moléculaire ainsi que leur réticulation par les enzymes de la famille des LOX (Csiszar, 2001; Kagan and Li, 2003; Lucero and Kagan, 2006).

a. L'élastine

L'élastine est le produit d'un seul et unique gène codant pour un précurseur : la tropoélastine. Cette chaîne polypeptidique est caractérisée par deux domaines fonctionnels s'alternant: un domaine hydrophobe et un domaine de liaison riche en lysine (Gray et al., 1973). Dans le RE, la tropoélastine est prise en charge par une protéine chaperonne l'EBP (Elastin Binding Protein) empêchant son agrégation prématurée. Cette protéine chaperonne reste associée à la molécule de tropoélastine jusqu'à sa sécrétion à proximité d'une fibre élastique en formation. Dans l'espace extracellulaire, les enzymes de la famille des LOX et notamment la LOX et LOX-L1, modifient les résidus lysine contenus dans le domaine de liaison (Bedell-Hogan et al., 1993; Hayashi et al., 2004). Cette réaction

va permettre à la molécule activée d'interagir avec les microfibrilles et être intégrée dans la fibre élastique en formation.

b. Les microfibrilles

La composition des microfibrilles est plus complexe que pour l'élastine. L'élément structural majeur est la fibrilline à laquelle vont s'associer d'autres protéines que sont essentiellement les Microfibrils Associated Glycoprotéins (MAGPs), les fibulines et l'EMILIN-1 (Kielty et al., 2002).

La fibrilline est une glycoprotéine de haut poids moléculaire dont trois isoformes ont été identifiées (fib-1 ; fib-2 et fib-3) (Corson et al., 2004; Lee et al., 1991; Sakai et al., 1986). De par leur domaine RGD (Arginine-Glycine-Aspartate), ces molécules vont adhérer directement à la surface cellulaire en interagissant spécifiquement avec certains récepteurs de la famille des intégrines ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) (Bax et al., 2003; Pfaff et al., 1996; Sakamoto et al., 1996). Enfin, grâce à un domaine de liaison héparine, les molécules de fibrillines vont s'associer avec des protéoglycanes de type héparane sulfate, une étape qui semble cruciale dans l'assemblage des microfibrilles (Ritty et al., 2003; Tiedemann et al., 2001).

MAGP-1 et MAGP-2 (codés par les gènes *mfap2* et *mfap5* respectivement) sont de petites glycoprotéines retrouvées dans les régions perlées des microfibrilles (Henderson et al., 1996).

MAGP-1 est très largement exprimée contrairement à MAGP-2, restreint à certains tissus. Ces protéines ont en commun de posséder deux domaines distincts : une moitié N terminal acide, riche en proline et la seconde moitié C terminal riche en résidus cystéine. Ce dernier domaine en position C terminale donne à ces glycoprotéines et notamment MAGP-1 la propriété de maintenir l'intégrité structurale des microfibrilles. En effet, cette région riche en cystéine permet de créer des ponts disulfures avec deux autres éléments majeurs des fibres élastiques, la tropoélastine et la fibrilline facilitant ainsi le processus d'élastogénèse (Jensen et al., 2001; Penner et al., 2002; Reinboth et al., 2002). De plus, ces petites glycoprotéines sont également à l'interface entre les fibres élastiques et d'autres protéines de la MEC. Ainsi, MAGP-1 a été décrite comme une molécule de pontage entre les fibres élastiques et la chaîne α_3 du collagène VI (Finnis and Gibson, 1997).

La famille des fibulines est une famille de glycoprotéines composée de 5 isoformes. Ces molécules sont caractérisées par un domaine globulaire en position C terminale appelé domaine III, précédé d'un

nombre variable de domaines EGF de liaison du calcium, le domaine II. Enfin le domaine N terminale ou domaine I, région la plus variable, permet de distinguer les différentes isoformes de fibuline (Argraves et al., 2003). Chacune de ces glycoprotéines ont une localisation distincte au sein de la fibre élastique. Ainsi la fibuline-1 est associée au noyau d'élastine (Roark et al., 1995) ; les fibulines-2 et 4 sont localisées à l'interface entre les microfibrilles et le noyau d'élastine (Kobayashi et al., 2007) ; la fibuline-3 se lie au précurseur de l'élastine (de Vega et al., 2009) ; et la fibuline-5 connecte les fibres élastiques au cytosquelette par l'intermédiaire d'intégrines (Nakamura et al., 2002). Chacune de ces isoformes possède donc un rôle qui lui est propre mais toutes ont pour but commun de faciliter le processus d'élastogénèse. De plus, ces glycoprotéines peuvent participer à l'organisation d'autres structures de la MEC. Ainsi, la fibuline-1 et la fibuline-2 peuvent s'associer au nidogène et à la laminine, deux éléments de la Membrane Basale (décrit dans le chapitre IV. B. 1) et par conséquent participer à l'assemblage de cette structure supramoléculaire (de Vega et al., 2009).

L'EMILIN-1 (Elastin Microfibrilles Interface Located proteIN) est une glycoprotéine multidomaine associée aux fibres élastiques (Bressan et al., 1993). Elle présente à l'extrémité N terminale un domaine riche en cystéine (le domaine EMI), en son centre une hélice α cruciale pour la formation d'une structure bispiralée et d'un motif riche en proline adjacent au domaine collagène. Enfin, en position C terminale, un domaine globulaire gC1q a été mis en évidence (Colombatti et al., 2000; Doliana et al., 2000). Comme son nom l'indique, l'EMILIN-1 est localisée à l'interface entre le noyau d'élastine et la microfibrille à l'origine de la fibre élastique d'intérêt (Colombatti et al., 2000). Une étude en démontrant que l'absence de cette glycoprotéine par l'utilisation d'un anticorps spécifique inhibait la formation des fibres élastiques dans des cellules musculaires lisses *in vitro* suggérant son rôle crucial dans le processus d'élastogénèse (Bressan et al., 1993). De plus, en fixant des molécules de TGF β inactif au niveau du domaine EMI, l'EMILIN-1 peut également moduler l'activité de ce facteur de croissance connu pour son rôle dans l'homéostasie de la MEC (Zacchigna et al., 2006).

De par leur capacité à rapidement s'expandre puis à revenir à leur morphologie initiale, les fibres élastiques sont des composants non négligeables de la MEC du TAB. L'expression de certains composés des fibres élastiques comme l'élastine, la fibrilline-1 ou MAGP-2 ont été ainsi récemment mis en évidence dans le TAB (Lopez et al., 2008; Spencer et al., 2011; Vaittinen et al., 2011).

3. Les glycoprotéines d'adhésion

Ces protéines associées à une courte chaîne glucidique interagissent avec d'autres protéines présentes à la surface des cellules. Dans de nombreux cas, cette liaison est permise par un motif unique présent au niveau de la glycoprotéine et reconnu spécifiquement par des récepteurs cellulaires. Ce motif de « reconnaissance », le domaine RGD, est reconnu par plusieurs membres de la famille des intégrines. La fibronectine, les ténectines et les laminines appartiennent à cette famille de glycoprotéine d'adhésion. La famille des laminines sera traitée dans le paragraphe IV. B. 1.

a. La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine ubiquitaire à haut poids moléculaires présente sous deux formes : une forme soluble produite par les hépatocytes et une forme cellulaire s'organisant en un réseau fibrillaire incorporée dans la MEC des tissus (White et al., 2008). Elle est le produit d'un seul et unique gène à l'origine de 12 isoformes distinctes chez les rongeurs et 20 isoformes chez l'Homme générées par des épissages alternatifs (Schwarzbauer, 1991). La protéine produite se présente sous la forme d'un dimère antiparallèle résultant de l'association de deux monomères identiques reliés par des ponts disulfures se formant en position C terminale (Hynes, 2009). La fibronectine est une protéine modulaire composée d'un domaine interagissant avec d'autres composés de la MEC comme les collagènes fibrillaires, la thrombospondine-1, le fibrinogène, la fibrilline et la tenascine C. Elle apporte à ces protéines un support architectural important pour leur assemblage (Dallas et al., 2006). La fibronectine possède également un domaine de liaison contenant le motif RGD, la liant à des récepteurs cellulaires que sont les intégrines et le syndécan-4. Ainsi, avec cette combinaison de domaines, cette glycoprotéine de la MEC peut interagir simultanément avec la cellule et d'autres composés de la matrice environnante. Par conséquent, le rôle majeur de la fibronectine est de participer à l'attachement et à la migration des cellules au sein de leur MEC (Franz et al., 2010).

La fibronectine joue également un rôle important dans le processus de différenciation cellulaire et notamment dans l'adipogénèse. En effet, lorsque des préadipocytes 3T3-F442a sont cultivés en présence d'une matrice de fibronectine, les modifications biochimiques et morphologiques signant la différenciation adipocytaire sont inhibées (Spiegelman and Ginty, 1983). Ceci suggère que la fibronectine présente dans la MEC des préadipocytes interfère dans le remodelage du réseau d'actine nécessaire dans la modification morphologique et important pour l'expression de gènes

lipogéniques. Cette modification du réseau d'actine passe notamment par le récepteur cellulaire, le syndécan-4, qui relie directement le réseau de fibronectine au cytosquelette d'actine. Ce sont les préadipocytes qui synthétisent et sécrètent la fibronectine à l'origine de leur matrice environnante (Nakajima et al., 2002). Cette synthèse peut alors être exacerbée lorsque les préadipocytes sont mis en présence de milieux conditionnés de macrophages inflammatoires (Keophiphath et al., 2009).

b. Les tenascines

Les tenascines sont une grande famille de glycoprotéines. Quatre membres ont été décrits à l'heure actuelle : la tenascine-C, la tenascine-R, la tenascine-W et la tenascine-X (Tucker et al., 2006). Chacune de ces isoformes est codée par un gène distinct. Ces protéines possèdent un domaine EGF-like, un domaine fibronectine de type III et un domaine C terminal fibrinogen-related (To and Midwood, 2011). L'expression de ces gènes est relativement faible en condition physiologique et est accentuée en période de développement embryonnaire, d'inflammation et de remodelage tissulaire (Goh et al., 2010; Midwood et al., 2004).

Dans l'espace extracellulaire, les tenascines s'organisent sous la forme de trimères ou d'hexamères dont les sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures au niveau de leur domaine N terminal riche en cystéine. De plus, dans le domaine fibronectin-like III, ces glycoprotéines possèdent un domaine à motif RGD leur permettant d'interagir avec des récepteurs cellulaires de la famille des intégrines (Leahy et al., 1992). Par ailleurs, les tenascines s'associent avec d'autres glycoprotéines de la matrice environnante telle que la fibronectine (Huang et al., 2001). Cette liaison empêche l'interaction de la fibronectine avec le syndécan-4 ce qui par conséquent influence le signal normalement médié par la fibronectine (Huang et al., 2001; Midwood et al., 2006; Orend et al., 2003). De par tous ces domaines et ces interactions, les tenascines jouent donc un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire, dans l'homéostasie tissulaire et dans la réponse pathologique (Trebaul et al., 2007).

Au niveau du TAB, notre équipe a mis en évidence que des préadipocytes inflammatoires, c'est-à-dire traités par des milieux conditionnés de macrophages, synthétisaient et sécrétaient de grandes quantités de tenascine-C (Keophiphath et al., 2009). Par conséquent, la présence dans la matrice environnante des préadipocytes inflammatoires de tenascine-C a des effets sur la matrice de fibronectine environnante. Ceci inhibe ainsi la différenciation adipocytaire. L'obésité étant caractérisée par une

inflammation de bas-grade, une étude a mis en évidence une augmentation importante de l'expression de la ténascine-C dans le TAv de sujets obèses (Catalán et al., 2012).

4. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) sont un groupe hétérogène de molécules possédant chacune une structure qui lui est propre mais ayant comme base commune une protéine « noyau » spécifique à laquelle 1 ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAG) s'associent par des liaisons covalentes (Cui et al., 2013; Schwartz and Domowicz, 2004). Les GAGs sont une classe de polysaccharides formés par la répétition d'un disaccharide le plus souvent sous une forme sulfatée composée d'un sucre amino-acétylé (le N-acetyl-galactosamine ou le N-acetyl-glucosamine) et d'un acide uronique (l'acide D-glucoronique ou L-iduronique). On trouve ainsi le dermatane sulfate, le keratane sulfate, l'héparine ou l'héparane sulfate (Couchman and Pataki, 2012; Iozzo, 1998; Schaefer and Schaefer, 2010). L'acide hyaluronique fait exception à cette règle ne possédant pas de protéine noyau (Schaefer and Schaefer, 2010).

Les PGs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques dont la nature de leur rôle dépend à la fois de leur localisation ainsi que du GAG qui les compose. L'une des fonctions communes à tous les types de PGs, de par leur localisation extracellulaire et leur propriété hydrophile importante, est de retenir une grande quantité d'eau et par conséquent de participer à l'hydratation des tissus. Ces molécules jouent par conséquent un rôle crucial dans la résistance des tissus aux forces de compressions. De plus, leur localisation extracellulaire fait de ces molécules des acteurs importants dans la mise en place et le maintien de l'intégrité de la MEC des tissus en interagissant directement avec les autres composants de la MEC comme les collagènes.

En plus de ces fonctions mécaniques et architecturales, les PGs participent également à la modulation directe ou indirecte de nombreux processus biologiques comme l'angiogenèse ou la réponse immunitaire (Frey et al., 2013). En effet de nombreux facteurs de croissance et cytokines possèdent un domaine de liaison à l'héparine ou à l'héparane sulfate. Par conséquent, ces molécules vont s'associer à certains PGs modulant ainsi leur biodisponibilité soit en les séquestrant soit en facilitant leur accessibilité à leur récepteur (Kim et al., 2011; Knox et al., 2002; Yamaguchi et al., 1990). De plus, suite au clivage protéolytique, certains PGs se présentent sous une forme soluble et interagissent

avec certains récepteurs médiant eux-mêmes directement certains processus biologiques (Frey et al., 2013).

Les PGs sont des composants ubiquitaires de la MEC. Par conséquent, ces molécules extracellulaires composent la MEC du TAB et participent à son activité biologique.

Ainsi, le biglycan, un membre la famille des PG acteur dans la fibrillogénèse du collagène I (Schönherr et al., 1995) et interagissant avec le TGF β (Hildebrand et al., 1994), est exprimé par les adipocytes (Adapala et al., 2012; Huber et al., 2007). Des études génomiques et protéomiques ont démontré que l'expression du biglycan augmentait au cours de l'adipogénèse (Hung et al., 2004; Molina et al., 2009). De ce fait, ce PG serait donc impliqué dans le programme adipogénique.

5. Les protéines matricielles

Le nom de « protéine matricielle » a été proposé par le groupe de Paul Bornstein, définissant ainsi un groupe de macromolécules présentes dans l'espace extracellulaire mais ne possédant aucun rôle direct dans la structure de la MEC. Ces protéines interagissent avec des récepteurs, des facteurs de croissance, des protéases mais également avec les protéines structurelles de la MEC du tissu sans avoir aucune fonction architecturale à proprement parlé (Bornstein, 1995, 2009).

Les membres originels décrits de la famille des protéines matricielles ont été la thrombospondine-1 (TSP-1), la tenascine-C et SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) (Sage and Bornstein, 1991). D'autres membres de cette famille ont été ensuite décrits : la thrombospondine-2, l'ostéopontine, la tenascine-X et les membres de la famille des CCN dont fait partie le CTGF (Connective Tissue Growth Factor).

Le rôle des protéines matricielles est complexe car dépendant des protéines de structures, des facteurs de croissance et des cytokines avec lesquelles elles s'associent. Bien que ces protéines ne participent pas directement à l'architecture de la MEC et que chaque protéine matricielle possède un rôle qui lui est propre, plusieurs caractéristiques et fonctions communes ont été identifiées.

Les protéines matricielles sont :

- Sécrétées par divers types cellulaires de manière transitoire et non constitutive.
- Associées à d'autres composants structuraux de la MEC, des récepteurs cellulaires, des cytokines ou des facteurs de croissance, et sont donc à l'interface entre les cellules et leurs matrices. Ces molécules jouent donc un rôle clé dans la régulation des comportements cellulaires face aux variations de l'environnement en modulant des voies de signalisation.
- « Désadhésives » c'est à dire que ces protéines en modifiant les adhésions focales et en réorganisant les fibres de stress créent un état d'adhérence intermédiaire. Ceci a pour conséquence d'induire des gènes relatifs à la réparation tissulaire et à l'adaptation (Murphy-Ullrich, 2001; Sage and Bornstein, 1991).
- Fréquentes dans les zones tissulaires subissant un remodelage physiologique ou pathologique.

Par conséquent, en condition physiologique la présence de protéines matricielles est assez faible dans le TAB. Néanmoins, l'expression de ces protéines étant induite au cours du remodelage tissulaire, nous verrons par la suite que leur taux augmente drastiquement dans le TAB au cours de l'obésité (Kong et al., 2014; Takahashi et al., 2001).

B. La Membrane Basale : une MEC spécialisée

La MEC, le squelette architectural tridimensionnel des tissus, s'organise en deux identités morphologiquement et biochimiquement distincts : la matrice interstitielle et la Membrane Basale (MB) (Linsenmayer et al., 1993; Timpl, 1989). La MB est une MEC spécialisée composée d'éléments qui lui sont propres. Elle est organisée sous la forme d'un fin feuillet en contact étroit avec la cellule présente à la base des épithéliums et des endothéliums. Elle est également synthétisée par les cellules musculaires et notre type cellulaire d'intérêt les adipocytes.

Morphologiquement, la MB est composée d'un assemblage de glycoprotéines et de protéoglycanes s'organisant en une structure supramoléculaire faisant l'interface entre la cellule et la matrice interstitielle de collagène fibrillaire. Du fait de sa localisation et de sa composition, elle apporte un

support architectural aux cellules, influence et modifie les comportements cellulaires en apportant des informations sur leurs environnements.

1. Composition de la Membrane Basale

L'hétérogénéité de la composition exacte et fine de la MB entre les tissus et au sein d'un même tissu rend complexe sa description précise et son rôle biologique. Néanmoins, quatre composants sont retrouvés de manière constante: le collagène IV, la laminine, le nidogène/entactine et le perlecan.

a. Le collagène IV

L'étude précise et détaillée de la composition des MBs a mis en évidence la présence d'un seul et unique collagène représentant 50% des composés de la MB et appartenant à la sous-famille des collagènes s'associant en réseau (voir tableau 3): le collagène IV. A ce jour, six chaînes α génétiquement distincts ($\alpha 1(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$) sont connues (Zhou et al., 1994). Les gènes codant pour chacune des chaînes α s'organisent par paire sur trois chromosomes différents, chaque paire partageant un promoteur bidirectionnel (col4a1/col4a2 ; col4a3/col4a4 et col4a5/col4a6) (Mariyama et al., 1994; Pöschl et al., 2004; Schmidt et al., 1993; Segal et al., 2001) (Figure 14).

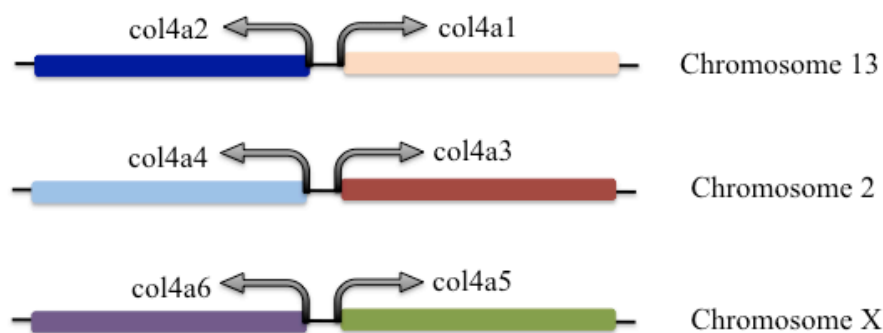


Figure 14: Organisation génomique des six gènes codant pour le collagène IV

Chaque chaîne α a une répartition tissulaire qui lui est propre dépendant notamment du rôle de la MB. Seules les chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ sont ubiquitaires. En revanche, les quatre autres chaînes possèdent une distribution tissulaire plus restreinte. En effet, les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ et $\alpha 5(\text{IV})$ apparaissent dans la MB glomérulaire du rein, du poumon, des testicules et des yeux. Les chaînes

$\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont exprimées par les cellules de la peau, les cellules musculaires lisses et celles du poumon (Hudson et al., 1993). De plus, dans certains tissus, l'expression de chacune des chaînes α varie au cours du développement permettant aux tissus d'acquérir une activité biologique appropriée. Ainsi, dans le rein, les chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ exprimées dans les phases précoces du développement, vont au cours de l'acquisition du phénotype rénal être remplacée par les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ et $\alpha 5(\text{IV})$ essentielles dans la fonction de filtre du rein (Hudson, 2004; Hudson et al., 2003).

Chaque chaîne α se décompose en trois domaines distincts : un domaine 7S en position N terminale, un domaine collagène en triple hélice et un domaine NC1 (Non Collagenous) riche en cystéine et lysine situé en position C terminale (Figure 15) (Hudson et al., 1993). Les domaines en triple hélice ou domaines collagène dans le cas du collagène IV ont la particularité de posséder une vingtaine d'interruption lui conférant un certain degré de flexibilité importante pour leur assemblage et structure supramoléculaire apportant une stabilité structurelle à la MB. Contrairement aux autres types de collagènes, les domaines globulaires NC1 et 7s du collagène IV persistent après sécrétion du protomère dans l'espace extracellulaire car leur présence est indispensable pour l'auto-assemblage des hétérotrimères entre eux pour former un réseau tridimensionnel stable. De par leur organisation génique et leur spécificité d'association, trois protomères ont été jusqu'à aujourd'hui décrit $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ possédant chacun un rôle qui lui est propre et adapté à la cellule qu'il structure (Figure 15).

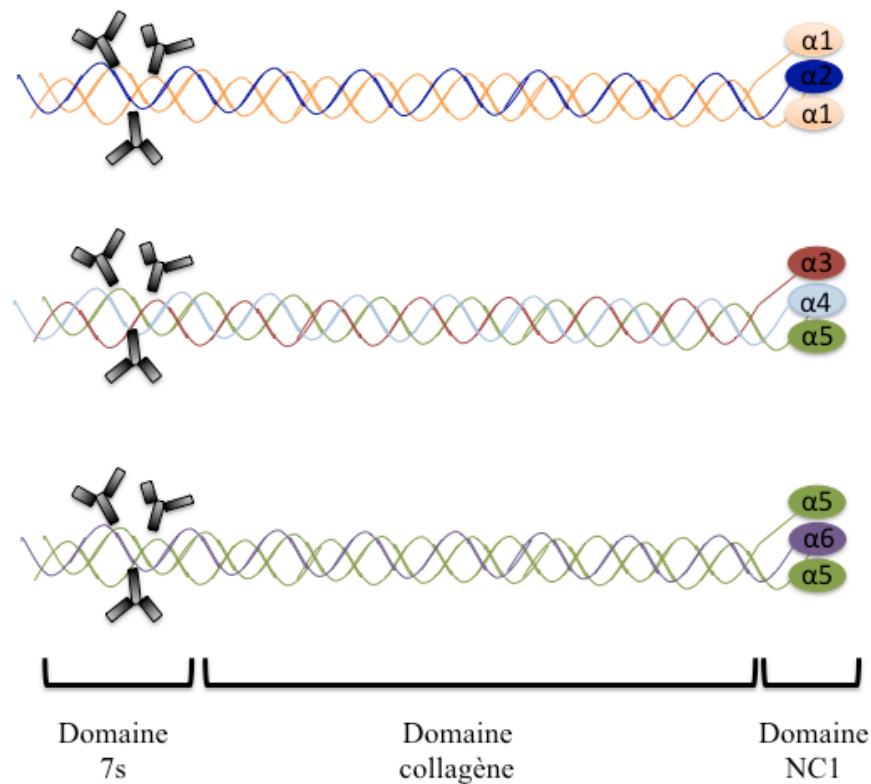


Figure 15 : Organisation en triple hélice des trois isoformes de collagène IV

b. Les laminines

Les laminines sont un groupe majeur de protéines hétérotrimériques non-collagènes retrouvées dans toutes les MBs. Elles résultent de l'assemblage d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'une chaîne γ associées entre elles par des pont disulfures. Cinq chaînes α , quatre chaînes β et trois chaînes γ ont été caractérisées chez les mammifères formant 15 isoformes différentes (Durbeej, 2010; Hallmann et al., 2005). La structure caractéristique des laminines est une croix asymétrique possédant trois bras courts et un bras long (Timpl and Brown, 1994) (Figure 16).

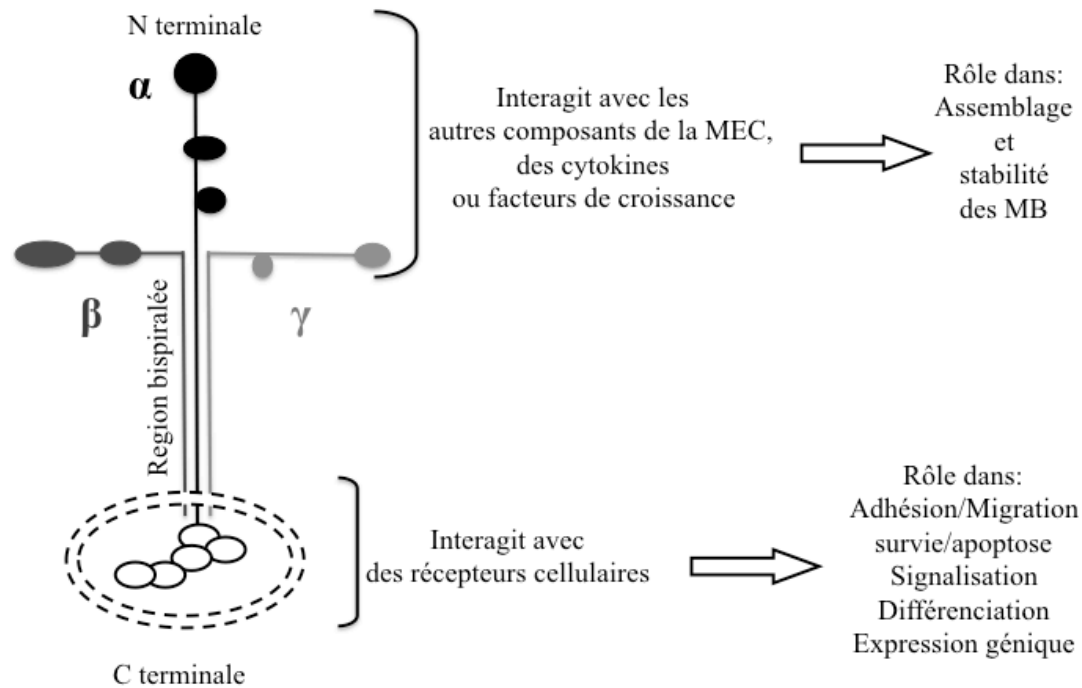


Figure 16 : Structure et fonction des laminines (d'après M. Aumailley)

Le bras long de la molécule finale résulte de l'association des extrémités C terminales caractérisées par un long domaine bispiralé des trois chaînes α , β et γ . Dans le cas des chaînes α , l'extrémité C terminale est plus longue et se termine par un domaine globulaire, le domaine G, se divisant en cinq modules distincts (LG1 à LG5) (Timpl et al., 1979). Le domaine bispiralé est le domaine plus conservé entre toutes les chaînes car il est crucial pour leur interaction structurant le bras long, un domaine crucial pour la liaison des laminines avec des récepteurs cellulaires. Par conséquent, cette extrémité C terminale module l'adhésion des MB aux cellules.

La distinction entre chaque chaîne de laminines est due à l'hétérogénéité des bras courts constituant les extrémités N terminales des trois chaînes α , β et γ . En effet, cette région possède trois domaines: le domaine N-terminal laminine (LN), le domaine EGF-like (LE) et le domaine laminine IV (L4/LF). Le bras court de chaque chaîne est caractérisé par ces trois domaines. Il diffère par la distribution et la répartition de ces trois domaines pour chaque chaîne. Par exemple, le bras court est sous une forme tronqué dans le cas des chaînes $\alpha4$ ou $\gamma2$. La présence de ces régions en position N terminale est

cruciale car elle est au cœur des interactions entre les molécules de laminines et d'autres protéines de la MEC, des cytokines ou des facteurs de croissance régulant ainsi leur biodisponibilité.

c. Les nidogènes

Les nidogènes également appelés entactines sont des glycoprotéines composées de 10% de glucides. Ces composants mineurs mais ubiquitaires des MBs représentent 2 à 3% de la composition en protéines de cette MEC spécialisée. Néanmoins, cette famille de glycoprotéine joue un rôle majeur dans l'organisation supramoléculaire des MBs (Erickson and Couchman, 2000; Hutter et al., 2000).

Deux isoformes génétiquement distinctes, le nidogène-1 et le nidogène-2, ont été identifiées chez les mammifères (Kimura et al., 1998). Ces deux glycoprotéines possèdent une structure modulaire commune formée de trois domaines globulaires (G1, G2 et G3) dont les domaines G1 et G2 sont séparés par un court domaine de liaison et les domaines G2 et G3 sont quant à eux reliés par une région en forme de tige plus longue (Figure 17). Le nidogène-1 et le nidogène-2 possèdent une grande similarité de structure notamment dans leurs domaines globulaires. En revanche, la différence entre ces deux isoformes provient des domaines de liaison reliant G1, G2 et G3 (Kohfeldt et al., 1998).



Figure 17: Structure modulaire des nidogènes

G1 ; G2 et G3 : domaine globulaire

La répartition de ces deux isoformes de nidogène est variable en fonction des tissus et au cours du développement (Kohfeldt et al., 1998). Ainsi l'expression du nidogène-2 est caractéristique de la MB endothéliale alors que le nidogène-1 possède une répartition plus ubiquitaire.

Une étude *in vitro* a démontré que le nidogène recombinant interagissait avec les trois autres composants de la MB : le collagène IV, la laminine et le perlecan (Fox et al., 1991). Pour cela, le domaine G3 possède un site de liaison à la laminine alors que le domaine G2 a une forte affinité pour le collagène IV et le perlecan (Fox et al., 1991; Hopf et al., 1999; Mayer et al., 1995). La présence de ces interactions suggère que la famille des nidogènes est un composant clé dans l'assemblage de la MB en favorisant l'interaction entre la laminine et le collagène IV ainsi qu'en intégrant les autres composants de la MB comme le perlecan (Timpl and Brown, 1996).

d. Le perlecan

Le perlecan est un protéoglycane héparane sulfate ubiquitaire des MBs formé d'une protéine noyau possédant cinq domaines (Figure 18) (Kallunki and Tryggvason, 1992; Murdoch and Iozzo, 1993). En position N terminale, au niveau du domaine I, trois molécules d'héparane sulfate vont s'associer de manière covalente à un module RGD contenu dans ce domaine (Dolan et al., 1997).

Chaque domaine de la protéine noyau possède des sites de liaison aux autres composés de la MB. Ainsi, la présence de ce PG dans les MBs et sa capacité à interagir avec les autres molécules suggèrent que le perlecan est impliqué dans l'assemblage et la structure de cette MEC spécialisée (Hopf et al., 1999; Reinhardt et al., 1993). De plus, le perlecan s'associe également à des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire que sont les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (Brown et al., 1997; Hayashi et al., 1992), l' α -dystroglycane (Peng et al., 1998; Talts et al., 1999) et bien d'autres molécules connues pour leur rôle dans l'assemblage de la MB (Bloch et al., 1997; Henry and Campbell, 1998). Tous ces éléments mettent en avant le rôle du perlecan dans l'architecture de la MB des tissus et le maintien de son intégrité.

Associé à cette fonction structurelle, le perlecan possède également la propriété de lier des molécules biologiquement actives et de réguler leur biodisponibilité. Ainsi, les chaînes latérales héparane sulfate possèdent la propriété de lier le Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) et servent ainsi de co-récepteurs

à ce facteur de croissance impliqué notamment dans l'angiogénèse (Aviezer et al., 1994). De plus, les domaines contenus dans la protéine noyau interagissent également avec d'autres facteurs de croissance régulant ainsi leur biodisponibilité (Figure 18) (Göhring et al., 1998; Jiang and Couchman, 2003; Sharma et al., 1998).

Enfin, la dégradation du perlecan peut générer la production de fragments bioactifs. Ainsi, la région C terminale de la protéine noyau est à l'origine de l'endorepellin. Or il a été démontré que ce fragment de perlecan possède une activité qui lui est propre modulant notamment l'angiogénèse (Bix et al., 2004).

Par conséquent, le perlecan est un PG ayant une fonction majeure de support architectural pour la MB mais possédant également un rôle dans la coordination d'événements tissulaires et cellulaires multiples et complexes.

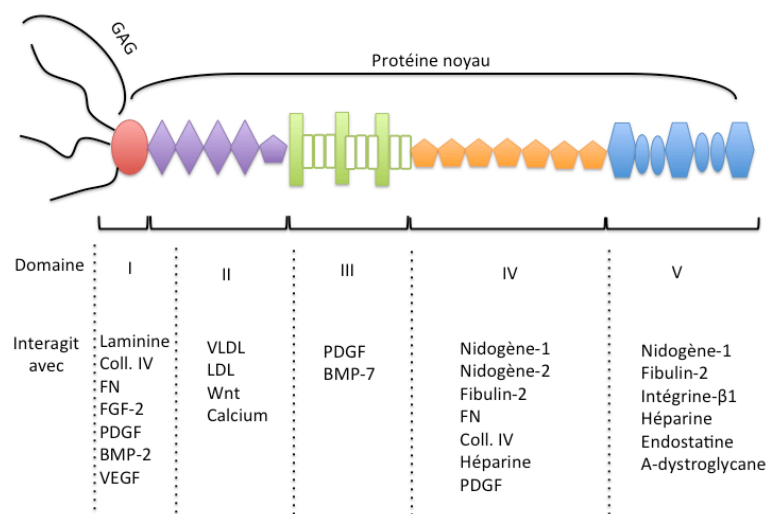


Figure 18: Structure schématique du perlecan et de ses différents domaines d'interaction (d'après Farah-Carson MC. *Glycobiology*. 2007)

GAG : Glycosaminoglycanes

2. Les récepteurs cellulaires

La Membrane Basale peut être considérée comme une extension de la membrane plasmique de la cellule la protégeant des contraintes physiques perturbatrices. Cette matrice spécialisée est une interface interactive entre la cellule et son environnement proche ou à distance transmettant des signaux au sein d'un même compartiment ou entre deux compartiments différents. Ces signaux vont être pris en charge par des récepteurs cellulaires interagissant directement avec les éléments de la MB que sont les intégrines, les dystroglycanes ou les Discoidin Domain Receptor.

a. Les intégrines

Les intégrines sont une grande famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques qui se composent d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Hynes, 2002). L'étude du génome humain a permis d'identifier 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent être assemblées de manière non-covalente en 24 hétérodimères fonctionnels (Plow et al., 2000). Chaque hétérodimère possède sa propre spécificité de ligands qui sont pour la grande majorité des intégrines des protéines de la MEC (Tableau 4). Par conséquent, chaque cellule possède son propre profil d'expression d'isoformes d'intégrines dicté par les protéines matricielles (Hemler and Lobb, 1995). Ces récepteurs relient ainsi physiquement la MEC environnante à la cellule. En effet, la fixation d'une protéine de la MEC à son intégrine d'intérêt induit dans la cellule le recrutement de protéines cytoplasmiques créant un complexe nécessaire dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Mitra et al., 2005). Ce remaniement intracellulaire participe à l'élaboration de structures adhésives spécialisées, les adhésions focales, essentielles pour l'ancrage des cellules à leur environnement et dans leur migration (Burridge et al., 1988).

Outre leur rôle d'ancrage, ces structures sont également impliquées dans de nombreuses voies de signalisation modulant le comportement cellulaire. En effet, de par l'absence d'activité catalytique propre aux intégrines, ces récepteurs doivent recruter des molécules accessoires pouvant pallier à cette absence. Ainsi, l'« adhésome » d'intégrines (Zaidel-Bar et al., 2007) est constitué de différents types de protéines kinases, phosphatases et adaptatrices (Tilghman and Parsons, 2008). Une protéine tyrosine kinase majeure, la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) a notamment été mise en évidence au niveau des adhésions focales jouant un rôle dans la transduction du signal intégrine et dans le

comportement cellulaire (Richardson and Parsons, 1996; Schaller and Parsons, 1994; Tilghman and Parsons, 2008). Toutes les isoformes d'intégrines contenant les sous-unités $\beta 1$ et αv possèdent la capacité d'activer la protéine FAK. L'activation de cette protéine initie une cascade de phosphorylation et d'interaction avec de nouvelles protéines requises pour former le complexe de signalisation. Ainsi, suite à la phosphorylation de la protéine FAK, la protéine kinase PI3K (Phosphatidylinositol-3-phosphate) est à son tour activée recrutant par conséquent la protéine Ser/Thr kinase, Akt. Or cette cascade de signalisation a pour but de moduler la survie cellulaire (Kumar, 1998; Tang et al., 1999).

De plus, les intégrines semblent influencer la signalisation de certains facteurs de croissance en interagissant avec leurs récepteurs (Alam et al., 2007).

Intégrines	Ligands
$\alpha v \beta 1$	Laminine; Fibronectine
$\alpha v \beta 3$	Fibrinogène; Tenascine; Thrombospondine; Fibronectine; MMP2; VEGF-A; Fibrilline-1; vWF
$\alpha v \beta 5$	Fibrinogène; Fibronectine; Thrombospondine
$\alpha v \beta 6$	Fibronectine; Fibrinogène; Tenascine; LAP-TGF β ; Fibrillin-1
$\alpha 1 \beta 1$	Collagène VI et I; Laminine
$\alpha 2 \beta 1$	Collagène IV et I; Laminine; Tenascine
$\alpha 3 \beta 1$	Laminine; VEGF-A; Thrombospondine
$\alpha 4 \beta 1$	Fibronectine
$\alpha 5 \beta 1$	Fibronectine; Fibrilline-1; Thrombospondine
$\alpha 6 \beta 1$	Laminine; Thrombospondine
$\alpha 7 \beta 1$	Laminine
$\alpha 8 \beta 1$	Thrombospondine; LAP-TGF β
$\alpha 9 \beta 1$	Tenascine; VEGF-A; VEGF-C; VEGF-D
$\alpha 10 \beta 1$	Collagène
$\alpha 11 \beta 1$	Collagène
$\alpha 6 \beta 4$	Laminine

Tableau 4 : Les intégrines et leurs ligands

(d'après Alam N. *Journal of cellular physiology*. 2007)

b. Les dystroglycanes

Le terme dystroglycane pour dystrophin-associated glycoprotein désigne un complexe protéique constitué de l'association non-covalente de deux sous-unités : l' α -dystroglycane (α -DG) et du β -dystroglycanes (β -DG) (Figure 19). La sous-unité β -DG est une protéine transmembranaire possédant un domaine C terminal intracytoplasmique. Par opposition, la sous-unité α -DG est quant à elle exclusivement extracellulaire (Figure 19).

Le complexe DG fut identifié en premier lieu dans les cellules musculaires squelettiques (Ervasti and Campbell, 1993; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Dans ce type cellulaire, ces protéines transmembranaires apportent une stabilité structurelle au sarcolemme au cours notamment de la contraction (Petrof et al., 1993). En effet, ces glycoprotéines fournissent un point d'ancrage nécessaire pour l'assemblage des laminines et par conséquent pour l'architecture de la Membrane Basale (Williamson et al., 1997). De plus, le domaine intracellulaire du β -DG interagit quant à lui avec le cytosquelette d'actine créant ainsi un lien physique entre la membrane basale et le cytosquelette des cellules musculaires striées contribuant à une contraction optimum (Campbell, 1995).

Des études d'expression ont par la suite démontré que les dystroglycanes étaient également exprimés dans d'autres types cellulaires (Durbeej et al., 1998; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992, 1993). Ainsi, la présence de ce complexe protéique a été mise en évidence dans les cellules épithéliales, les cellules du glomérule rénal, les cellules endothéliales ou les adipocytes, cellules possédant une MB (Durbeej et al., 1998; Gritsenko et al., 2012).

En plus de sa fonction structurale importante grâce à sa haute affinité entre autres pour les laminines, le complexe DG a été également impliqué dans différentes voies de signalisation. Ainsi, l'interaction de ce complexe protéique avec la laminine $\alpha 2$ déclenche la phosphorylation du domaine cytoplasmique de la sous-unité β -DG (Menezes et al., 2014; Sotgia et al., 2001). Cet événement va alors induire une cascade de réaction biochimique menant à la réorganisation du cytosquelette de la cellule (Russo et al., 2000). De plus, la forme phosphorylée va alors interagir et activer la protéine kinase FAK, une enzyme tyrosine kinase impliquée dans des voies de signalisation régulant le comportement cellulaire face à son environnement (Cavaldesi et al., 1999). Enfin, l'interaction entre

l' α -DG et la laminine va moduler l'activité de l'enzyme apoptotique, la caspase-3, et la voie de signalisation PI3K/Akt, des enzymes modulant la survie cellulaire (Datta et al., 1999).

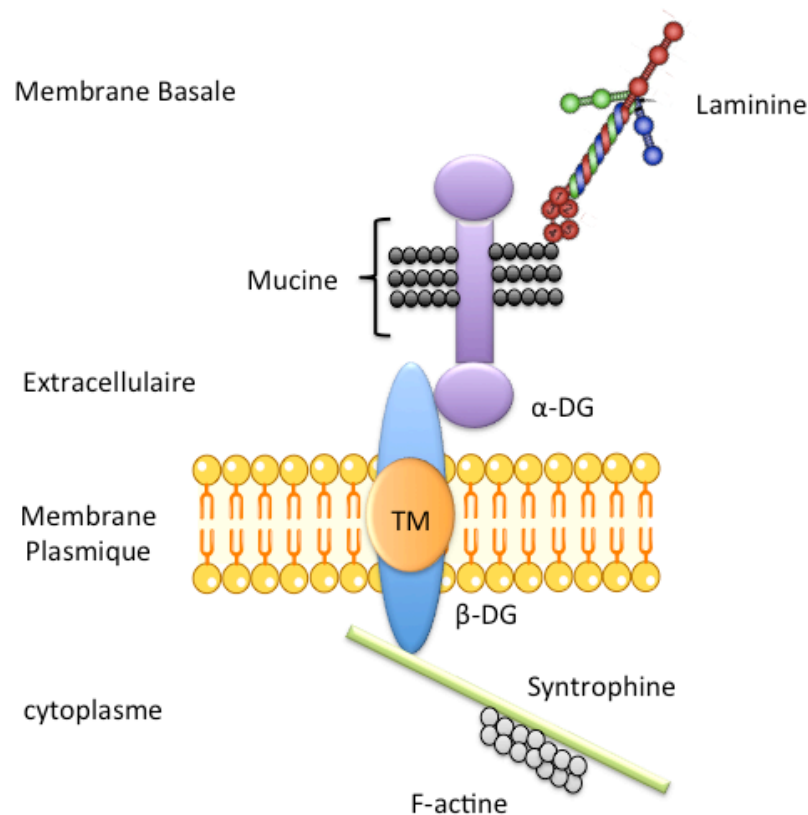


Figure 19: Représentation schématique du complexe dystroglycane et de ses ligands extra- et intracellulaires (d'après Barresi R. *Journal of Cell Science*. 2006)

TM : TransMembranaire ; α -DG : α -Dystroglycane ; β -DG : β -Dystroglycane

c. Discoidin Domain Receptor

Les protéines de la famille des Discoidin Domain Receptor (DDR), DDR1 et DDR2, appartiennent à la superfamille des RTK (récepteurs tyrosine kinase). Par conséquent, les DDRs possèdent un seul et unique domaine transmembranaire associé à un domaine tyrosine kinase cytoplasmique en position C terminale. Cette famille de RTK a la particularité d'être formée de deux domaines globulaires N terminale extracellulaires étroitement liés, un domaine Discoidin Homology (DS) et un domaine Discoidin-like (Carafoli and Hohenester, 2013). Ces domaines globulaires sont relativement conservés entre les différentes isoformes existantes. La distinction entre DDR1 et DDR2 est apportée

par le domaine extracellulaire situé juste en amont de la région transmembranaire (Figure 20) présentant une variabilité (Carafoli and Hohenester, 2013). De plus, cinq sous-isoformes ont été décrites pour le récepteur DDR1 notées DDR1a, DDR1b, DDR1c, DDR1d et DDR1e. De ces cinq protéines, trois DDR1 sont des récepteurs fonctionnels (DDR1a, DDR1b et DDR1c). En effet, les récepteurs DDR1d et DDR1e sont des protéines tronquées pour lesquelles le domaine tyrosine kinase est absent (Figure 20).

Les DDRs sont les seuls récepteurs de la famille des RTKs à être activés par les collagènes (Kadler et al., 2007). Les protéines DDR1 et DDR2 possèdent une large spécificité de ligand et un récepteur est activé par différents types de collagènes. Alors que les collagènes fibrillaires s'associent aux deux types de DDRs (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997), les collagènes non-fibrillaires sont reconnus avec des préférences distinctes. Ainsi, DDR1 et non DDR2 s'associe spécifiquement au collagène IV (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997) alors que DDR2 se lie préférentiellement au collagène X (Leitinger and Kwan, 2006).

Suite à la fixation des collagènes, les DDRs subissent une étape d'autophosphorylation au niveau de plusieurs tyrosines présentes dans leurs domaines cytoplasmiques. Ces résidus phosphorylés vont ainsi fournir des sites d'ancrage pour le recrutement de molécules de signalisation (Lemmon and Schlessinger, 2010). De ce fait, plusieurs protéines ont été identifiées comme molécules impliquées dans les voies de signalisation médiées par les récepteurs DDR1 et DDR2 (Lemeer et al., 2012). La majorité de ces acteurs participent à la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Un des rôles clés dans lequel sont impliqués les récepteurs DDR1 et DDR2 est la régulation de l'expression et de l'activité des Matrix Metalloproteinases (MMPs) (Hou et al., 2001, 2002). En effet, par des études d'inhibition notamment du récepteur DDR1, il a été démontré que ce récepteur modulait l'expression des enzymes MMP-2 et MMP-9 (Hou et al., 2001). De par leur rôle dans la régulation de l'expression et de l'activité des MMPs, les DDRs ont un rôle crucial dans le remodelage de la MEC et par conséquent dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus.

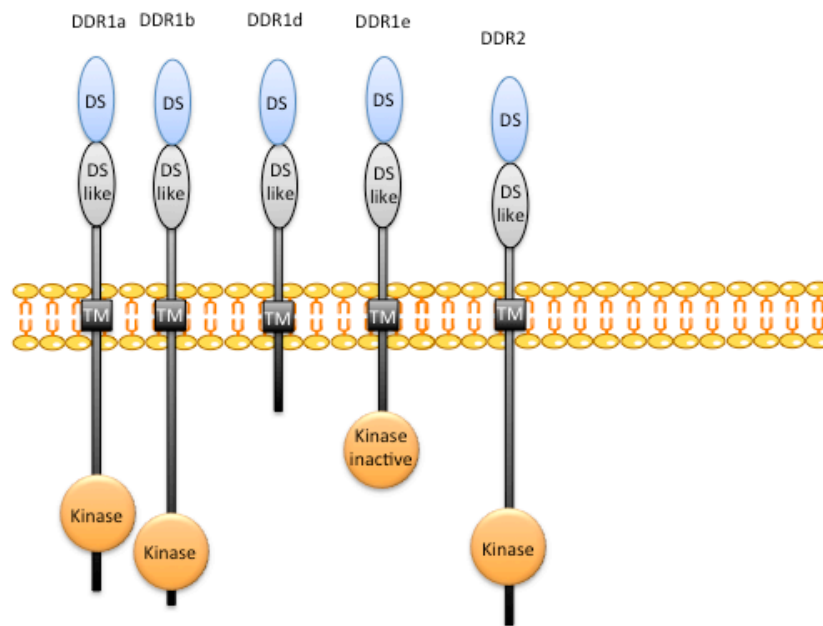


Figure 20: Structure schématique des Discoidin Domain Receptor

(adapté de B. Leitinger. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014)

TM : domaine TransMembranaire ; DS : domaine Discoidin ; DS-like : domaine Discoidin-like

C. Remodelage physiologique et physiopathologique de la MB

1. Assemblage de la MB

Le processus de formation de la MB est en grande partie dû à l'auto assemblage de ses deux composants majeurs, la laminine et le collagène IV, dans l'espace extracellulaire formant un fin feuillet en contact étroit avec la membrane cellulaire.

Les laminines sont essentielles dans l'élaboration de la MB puisqu'elles sont responsables de l'organisation de l'assemblage de cette MEC spécialisée. Ainsi, la délétion génétique d'une des chaînes de laminine dans un tissu spécifiquement entrave la formation de la MB (Miner et al., 2004; Smyth et al., 1999). Par opposition, l'absence des autres composants comme le collagène IV n'affecte pas de manière significative leur assemblage mais a néanmoins des conséquences plus tardives sur la structure et la fonction de cette MEC spécialisée (Pöschl et al., 2004).

La grande majorité des isoformes de laminines une fois excrétées dans l'espace extracellulaire ont la propriété de s'auto-assembler pour former un réseau en contact direct avec la membrane cellulaire. Le

processus initial dans la formation de ce réseau de laminine semble dépendre essentiellement de l'interaction du domaine G situé en position C terminale des chaînes α de chaque molécule avec des récepteurs cellulaires que sont les intégrines et les dystroglycanes précédemment décrits. De ce fait, la désorganisation du domaine G limite la fixation des molécules de laminines à ces récepteurs cellulaires aboutissant à un défaut de formation de la MB dans plusieurs modèles cellulaires (Li et al., 2002, 2005; McKee et al., 2007; Tsiper and Yurchenco, 2002). Le rôle des intégrines, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$, comme récepteurs principaux des modules LG1, LG2 et LG3 des laminines a été mis en évidence (Deutzmann et al., 1990; Gee et al., 1993; Ido et al., 2007). Les domaines LG4 et LG5 vont quant à eux interagir spécifiquement avec les dystroglycanes (Gee et al., 1993; Ido et al., 2007; Smirnov et al., 2002; Talts et al., 1999). L'adhésion des laminines aux surfaces cellulaires permet ainsi d'augmenter leur concentration locale favorisant ainsi leur polymérisation. De ce fait, les molécules de laminines s'associent entre elles par l'entremise du domaine LN en position N terminale des trois chaînes α , β et γ formant un complexe stable tripartite dans lequel les bras courts des chaînes α , β et γ proviennent chacun de laminines distinctes voisines (McKee et al., 2007; Yurchenco and Cheng, 1993) (Figure 21).

Le collagène IV, l'autre composant majeur, n'a pas de rôle à proprement parler dans l'organisation de l'assemblage de la MB. En effet, sa délétion chez *C. Elegans* a pour conséquence une létalité embryonnaire plus tardive due à un défaut dans la contraction musculaire une fois que celle-ci est nécessaire (Guo et al., 1991). Ces résultats suggèrent que le collagène IV, une fois polymérisé, confère aux MB une résistance aux stress mécaniques.

Les protomères de collagène IV excrétés dans l'espace extracellulaire ont la propriété de s'auto-assembler en un réseau polymérisé stabilisé par des liaisons covalentes au niveau de leurs deux extrémités, les domaines 7s et NC1. Ainsi, les domaines 7s de quatre protomères différents interagissent pour former un tétramère. Ce complexe va par la suite être stabilisé par des ponts disulfures (Duncan et al., 1983). A l'opposé, en position C terminale, les domaines NC1 de deux protomères voisins vont s'associer afin d'étendre le réseau de collagène IV en cours de formation (Figure 21). Cette dernière association est importante car les domaines NC1 définissent la spécificité de liaison entre les trois protomères connus, $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$, de collagène IV (Boutaud

et al., 2000). Le réseau de collagène IV ainsi conçu constitue une suprastructure tridimensionnelle à laquelle vont s'associer des composés mineurs que sont le nidogène et le perlecan afin de stabiliser la MB en cours de formation.

Le nidogène est sécrété dans l'espace extracellulaire sous la forme d'un monomère et ne passe pas par une étape de polymérisation. Les molécules de nidogène vont intégrer les réseaux de laminines et de collagènes IV formés afin de les associer de manière stable et d'influencer l'intégrité structurale de la MB. Pour cela, le domaine globulaire G3 des molécules de nidogène interagit avec les chaînes γ des laminines alors que le domaine G2 possède un domaine de reconnaissance du domaine en triple hélice du collagène IV. Cette interaction bilatérale permet de former un pont stable entre les deux réseaux de collagène IV et de laminine (Miosge et al., 1999).

Le perlecan, l'autre composant mineur, participe également à la stabilité des MB. En effet, la protéine noyau du perlecan s'associe à la fois au domaine G2 du nidogène et au domaine en triple hélice des molécules de collagènes IV. De plus, les chaînes de GAG vont interagir avec les domaines NC1 des molécules de collagènes IV et LG5 des chaînes α des laminines. De ce fait, le perlecan contrairement aux molécules de nidogène possède la propriété de s'associer aux réseaux de collagène IV et de laminine via différents sites de liaison (Yurchenco and O'Rear, 1994).

L'assemblage supramoléculaire des MB est un processus extrêmement complexe et variable qui s'élabore dans les étapes précoces du développement (juste après l'étape d'implantation) (Costello et al., 2009). Cette hétérogénéité dans l'élaboration de cette MEC spécialisée dépend du type de tissu et de son état physiologique et/ou physiopathologique.

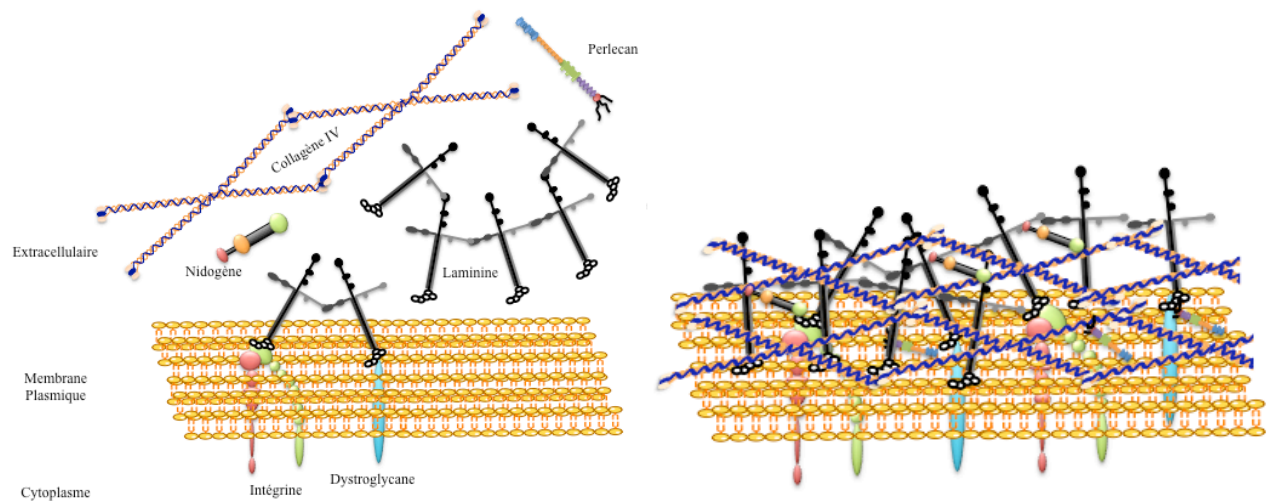


Figure 21: Assemblage des composants de la Membrane Basale (d'après JK Mouw. Nature reviews 2014).

Les molécules de laminines forment un fin feuillet en contact direct avec la surface cellulaire via des interactions mettant en jeu des intégrines ou des dystroglycane. Les molécules de collagène IV forment un réseau au dessus du feuillet de laminines. Ces deux réseaux vont être stabilisés par des molécules de nidogène et de perlecan.

2. Dégradation des composés de la MB

La MB comme tout élément de la MEC est une structure extrêmement dynamique et par conséquent sujet à un remodelage perpétuel (Hynes, 2009). Le processus clé du remodelage est la dégradation des composés formant la MB permettant une expansion rapide et transitoire des tissus régulant ainsi les comportements cellulaires en modifiant les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice (Daley et al., 2008). De plus, le clivage de certaines protéines libère des molécules biologiquement actives pouvant moduler les fonctions cellulaires.

Deux familles d'enzyme majeures participent à la dégradation des composés des MEC et par conséquent de la MB : la famille des Matrix Metalloprotéinases (MMPs) et la famille des Adamalysines.

a. Les Matrix Metalloprotéinases (MMPs)

Les MMPs sont la principale famille d'endopeptidases Zinc-dépendante dont le rôle central est de dégrader les composés matriciels. Chez l'humain, 23 MMPs ont été décrites et classées en 5 groupes fonctionnels : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines et les MMPs

transmembranaires (MT-MMP) dépendant essentiellement de leurs substrats matriciels (Tableau 5). Toutes ces enzymes partagent des similarités structurelles mais ont néanmoins des profils d'expression et des substrats distincts (Tableau 5).

A l'exception des MT-MMPs, la grande majorité des MMPs sont sécrétées sous la forme d'une proenzyme inactive nommé zymogène. L'activation de ces enzymes passe par un clivage protéolytique catalysé par des serine protéases ou d'autres MMPs (Ra and Parks, 2007). Une fois les MMPs activées, leur fonction protéolytique est également modulée au sein des tissus par d'autres protéines les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteases). Quatre TIMPs ont été décrites (TIMP1 à 4) comme régulateurs naturels des MMPs (Black et al., 1996; Murphy et al., 2003). Ces 4 protéines possèdent une analogie structurelle très forte mais chacune a ses propres caractéristiques suggérant des propriétés biochimiques distinctes (Baker et al., 2002; Brew et al., 2000). Ces protéines inhibitrices interagissent spécifiquement avec différentes MMPs formant un complexe stable (Tableau 5).

De nombreuses MMPs, possèdent la propriété de dégrader les différents composés de la MB. Néanmoins, deux MMPs ont été particulièrement impliquées dans ce processus : la sous-famille des gélatinases c'est à dire MMP-2 et MMP-9. Ainsi, outre leur rôle dans le clivage de la gélatine (collagène dénaturé), ces deux enzymes ont été mises en évidence comme des acteurs majeurs de la dégradation du collagène IV (Chakrabarti and Patel, 2005). De ce fait, MMP-2 et MMP-9 ont été impliquées dans de nombreuses pathologies caractérisées par un remodelage anormal de la MB dû à un déséquilibre de la balance synthèse/dégradation créant une dysfonction tissulaire (Fukami et al., 2014; Kowluru et al., 2012).

Collagénases	Substrats	Inhibiteurs
MMP-1	Collagène I, II, III, perlecan, téna-scine, FN, nidogène, pro-TNF	TIMP-1
MMP-8	Collagène I, II, III, FN	TIMP-1 et 2
MMP-13	Collagène I, II, III IV, VII, FN, laminine-1, PAI-1	TIMP-1, 2 et 3
Gélatinases		
MMP-2	Collagène I, IV, V, FN, téna-scine, nidogène, laminine-5, pro-TGF- β	TIMP-2
MMP-9	Collagène I, IV, V, élastine, FN, décorine, , pro-TGF- β	TIMP-1
Stromélysines		
MMP-3	Collagène III, IV, V, élastine, FN, laminine-1, nidogène, téna-scine	TIMP-1
MMP-10	Collagène III, IV, V, élastine, FN, laminine-1, nidogène	TIMP-1 et 3
MMP-11	IGFBP	TIMP-1
MMP-12	Collagène IV, élastine, laminine-1, nidogène, FN	TIMP-1 et 3
Matrilysines		
MMP-7	Collagène IV, élastine, FN, laminine-1, nidogène, téna-scine,	NC
Matrilysine-2	Collagène IV, FN,	NC
MMP-26	Collagène IV, FN	NC
MT-MMP		
MMP-14	Collagène I, II, III, FN, laminine-1 et 5, nidogène, téna-scine, FN, perlecan	TIMP-2
MMP-15	Laminine-1, FN, nidogène, téna-scine, perlecan	NC
MMP-16	Collagène III, FN, laminine	NC
MMP-17	FN, fibrilline, pro-TNF	NC
MMP-24	Collagène I, FN, laminine	NC
MMP-25	Collagène IV, laminine-1, FN, fibrine	NC
Autres		
MMP-19	Collagène IV, laminine-1, nidogène, téna-scine, FN	NC

Tableau 5: Les MMPs, leurs substrats et leurs inhibiteurs (d'après T. Klein. *Amino Acids*. 2011).

NC : Non connu ; FN : Fibronectine ; IGFBP : Insulin Growth Factor binding protein

b. Les adamalysines (ADAM et ADAMTS)

Cette famille d'enzymes regroupe les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinases) et les ADAMTS (ADAMs possédant un motif Thrombospondine). Chez l'humain, 12 ADAMs et 19 ADAMTS ont été décrits (Apte, 2004; Murphy, 2008).

Les ADAMs sont connus pour leur rôle dans le clivage du domaine extracellulaire de protéines transmembranaires libérant ainsi des molécules biologiquement actives. Néanmoins, quatre ADAMs, ADAM-9, -10, -12 et -15 participent à la dégradation de certains composés de la MEC. Ainsi, ADAM-10, -12 et -15 ont notamment été mis en évidence dans le remodelage de la MB puisque l'un de leurs substrats principaux est le collagène IV (Endres and Fahrenholz, 2010; Martin et al., 2002; Roy et al., 2004).

Les ADAMTS quant à eux contrairement aux ADAMS sont principalement responsables de la dégradation des éléments matriciels de type protéoglycanes. En effet, de nombreuses isoformes (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16, -18) de cette famille de protéases possèdent une activité protéoglycanases. Néanmoins d'autres membres de cette famille tels que ADAMTS-2, -3 et -14 participent à l'élimination des prodomaines des collagènes fibrillaires (Apte, 2004).

c. Autres protéases de dégradation de la MB

Associé à ces deux familles d'enzymes majeures dans le remodelage matriciel, d'autres protéases ont été également mises en évidence pour leur rôle dans la dégradation de certains composés de la MB. C'est ainsi le cas de certaines Serine protéases telles que la plasmine qui possède pour substrat entre autres la laminine et contribue ainsi au remodelage de la MB (Smith and Marshall, 2010).

La famille des cathepsines, une famille de protéases essentiellement lysosomales, a également été impliquée dans le remodelage de la MB (Fonović and Turk, 2014; Roycik et al., 2009). En effet, certaines isoformes sécrétées ont pour substrat des protéines extracellulaires. Ainsi, les cathepsines B, L et D sont impliquées dans le remodelage de la MB car elles possèdent la propriété de dégrader le collagène IV et la laminine (Sloane, 1990; Sloane et al., 1990).

L'architecture et l'intégrité de la MB comme toutes les MECs dépendent par conséquent d'un équilibre très fin entre la synthèse et la dégradation des éléments qui la composent. A la moindre perturbation de cet équilibre dans un sens ou autre, cela a des conséquences sur l'architecture de la MEC, donc du tissu et par conséquent sur sa fonction.

3. Pathologie de la MB

La MB étant une structure cruciale dans l'architecture et dans le maintien de l'intégrité cellulaire, un remodelage non adapté à sa suprastructure tridimensionnelle et à sa fonction a des conséquences sur la fonction cellulaire et tissulaire pouvant aboutir à des pathologies sévères. En effet, l'importance du maintien de l'intégrité et de la structure des MB dans les tissus a été mise en évidence par la description de nombreuses pathologies dans lesquelles des mutations ou modifications induites de certains composés affectent directement la composition et la structure de la MB. Ce phénomène est alors à l'origine de nombreuses pathologies héréditaires ou acquises.

a. Pathologies héréditaires de la MB

Plusieurs pathologies résultent des mutations génétiques affectant au moins l'un des composants de la MB, généralement le collagène IV, et étant par conséquent à l'origine d'un remodelage drastique affectant la fonction tissulaire.

- Le syndrome d'Alport est un des syndromes caractéristiques des maladies héréditaires dû à un remodelage anormal de la MB. Les symptômes de cette pathologie sont la néphropathie glomérulaire évoluant en une insuffisance rénale terminale, une surdité et une affection oculaire (Gubler, 2008; Hudson et al., 2003). La cause du syndrome d'Alport est le résultat d'une mutation affectant les gènes *COL4a3*, *COL4a4* ou *COL4a5*. La mutation de ces gènes modifie alors les protomères $\alpha3\alpha4\alpha5$ et $\alpha5\alpha5\alpha6$ présents uniquement dans certains tissus et notamment dans les tissus rénaux, rétiniens et auditifs. Au niveau ultrastructural, la MB et surtout la MB glomérulaire des patients atteints du syndrome d'Alport manifeste une alternance de zones épaissies et amincies lui donnant un aspect feuilleté (Haas, 2009). De ce fait, au niveau glomérulaire, la fonction de filtration de la MB est affectée et par conséquent aboutit à la présence de trace de sang et de protéines dans les urines.

- Le syndrome HANAC (Hereditary Angiopathy with Nephropathy, Aneurysms and muscle Cramps) est une seconde pathologie héréditaire affectant la MB basale de certains tissus (Plaisier et al., 2007). Contrairement au syndrome d'Alport, le syndrome HANAC est la conséquence d'une mutation faux-sens du gène *COL4A1* constituant le protomère $\alpha1\alpha1\alpha2$. Or ce trimère étant largement exprimé dans de nombreuses MB, une mutation affectant l'un des gènes codant pour l'une des chaînes le constituant se traduit par une atteinte systémique. L'étude ultrastructurale des MB touchées par la mutation faux-sens de *COL4A1* a révélé des structures irrégulières et épaissies. Au niveau des zones épaissies, la MB apparaît sous une forme feuilletée comme observée dans le syndrome d'Alport. Le rein est un des tissus lésés chez les patients atteints du syndrome HANAC. Contrairement au syndrome d'Alport, le trimère $\alpha1\alpha1\alpha2$ est présent au niveau des MB tubulaires et de la capsule de Bowman. En revanche, ce protomère est très minoritaire au niveau du glomérule rénal qui n'est pas ou peu touché. Les signes rénaux caractéristiques du syndrome HANAC sont une hématurie sans protéinurie.

La seconde manifestation de cette pathologie est l'atteinte microvasculaire cérébrale caractérisée par le développement de leucoencéphalopathie (démýélinisation progressive). Les patients atteints du syndrome HANAC présentent alors des tortuosités artériolaires rétinienne bilatérales typiques asymptomatiques mais pouvant néanmoins se compliquer par des épisodes d'hémorragies rétinienne donnant lieu à une acuité visuelle transitoire. Enfin, la dernière manifestation du syndrome HANAC est la survenue de crampes musculaires. Néanmoins, ce symptôme reste encore à ce jour très peu expliqué.

Les symptômes relativement similaires entre ces deux syndromes dus essentiellement à une dysfonction vasculaire démontrent que la moindre perturbation de la MB dans un tissu a des répercussions pathologiques sur son activité biologique.

b. Pathologies environnementales de la MB

La néphropathie et la rétinopathie diabétique sont deux pathologies ayant en commun un mécanisme physiopathologique fondamental: l'épaississement important de la MB des capillaires des tissus rénaux et rétiens (Ashton, 1974; Friedenwald, 1953). Ce remodelage anormal survenant au cours de ces deux complications microvasculaires du diabète aboutit respectivement à une insuffisance rénale chronique et une cécité (Folli et al., 2010). Cet événement est la conséquence d'une accumulation excessive de composés de la MB empiétant sur la matrice interstitielle et engendrant une dysfonction de l'activité biologique du tissu lésé. Le collagène IV notamment a été mis en évidence comme un élément majeur de la fibrose retrouvée dans la rétine et le rein diabétique (Abe et al., 2004; Hasslacher and Wahl, 1980).

L'hyperglycémie chronique caractéristique du diabète a un rôle central dans l'induction de l'épaississement de la MB. En effet, la présence de fort taux de glucose (entre 30 et 50 mM) dans le milieu de culture de cellules du tubule rénal ou de cellules endothéliales de la rétine induit la surexpression et la surproduction de différents composés matriciels et notamment de collagène IV (Oshitari et al., 2006; Roy et al., 1990; Spiro et al., 1995). Différentes voies moléculaires ont été identifiées comme médiateurs de l'effet cytotoxique de l'hyperglycémie: la voie des polyols (Sugimoto H), de la PKC (Protein Kinase C) (Juan et al., 2012), des hexosamines (Riedl et al., 2011) et des AGE (Advanced Glycation End products) (Ojima et al., 2012). La progression des complications microvasculaires due à un mauvais contrôle de la glycémie dépend par conséquent de différents mécanismes moléculaires rendant complexe l'identification précise de la pathogénèse. De ce fait, une liste exhaustive de tous les facteurs moléculaires dépasserait le champ de ce manuscrit. Néanmoins, nous nous focaliserons sur le rôle d'un seul et unique acteur important le TGF β (Transforming Growth Factor).

Ce facteur est connu pour son action pro-fibrogénique, dont l'action de l'isoforme 1 a été amplement étudiée dans l'étiologie de la néphropathie et de la rétinopathie diabétique (Ziyadeh, 2004). L'hyperglycémie induit une augmentation de l'expression et de la production du TGF β 1 dans des

cellules tubulaires rénales et mésangiales *in vivo* et *in vitro* (Hoffman et al., 1998; Wolf et al., 1992). De plus, une augmentation de l'expression dans les compartiments glomérulaires et tubulaire ainsi que du taux circulant de TGF β 1 a été mise en évidence chez des sujets diabétiques (Ziyadeh, 2004).

Le TGF- β appartient à une superfamille de molécules de signalisation regroupant une trentaine de membres dont les BMP (Bone Morphometric Protein) et les Activines. Trois isoformes génétiquement distinctes, le TGF β 1, le TGF β 2 et le TGF β 3, ont été identifiées. Les trois molécules structurellement similaires sont sécrétées sous une forme latente, la forme mature étant associée de manière non-covalente dans l'appareil de Golgi à une protéine LAP (Latency Associated Protein) (Annes et al., 2003). Ce complexe inactif va être sécrété dans l'espace extracellulaire où il peut alors de nouveau s'associer avec une autre protéine la LTBP (Latent TGF β Binding Protéin) séquestrant le facteur de croissance excrété dans la MEC dans l'attente d'une activation. De nombreux acteurs moléculaires ont été désignés comme activateurs du TGF β dont:

- Les intégrines α_v qui ont la propriété de modifier le TGF β sous une forme latente en TGF β mature sans aucun clivage protéolytique (Annes et al., 2003). Pour cela, l'interaction du facteur de croissance sous sa forme latente avec une intégrine α_v induit un changement de conformation permettant la libération de la forme active du TGF β .
- Deux métalloprotéases ont été impliquées dans un clivage protéolytique, les gélatinases MMP-2 et MMP-9 (Jenkins, 2008; Yu and Stamenkovic, 2000). Ces enzymes vont alors catalyser la réaction de libération de la forme mature du TGF β .

La molécule activée peut alors interagir avec son récepteur de la famille des Serine/Thréonine kinase. Ce récepteur est composé de deux sous-unités le récepteur du TGF β de type I et le récepteur du TGF β de type II (Massagué et al., 1994). Le TGF β s'associe spécifiquement à la sous-unité de type II du récepteur qui va alors recruter et phosphoryler le récepteur de type I (Massagué, 1998). Cet évènement moléculaire conduit à l'activation des voies intracellulaires médiant la signalisation du TGF- β et notamment la voie des Smads (Massagué, 2012). Cette famille de protéines cytoplasmiques

est divisée en trois groupes fonctionnels permettant de transmettre le signal du TGF β : 1- les R-Smads qui s'associent aux récepteurs de type I pour être activés par phosphorylation (Smad1, Smad2 et Smad3), 2- les co-Smads qui s'associent au R-Smad afin de former un facteur de transcription actif pouvant moduler l'expression de gènes cibles (Smad4) et 3- les Smads inhibiteurs qui en interagissant avec le récepteur de type I empêchant l'activation des R-Smads (Smad7) (Figure 22).

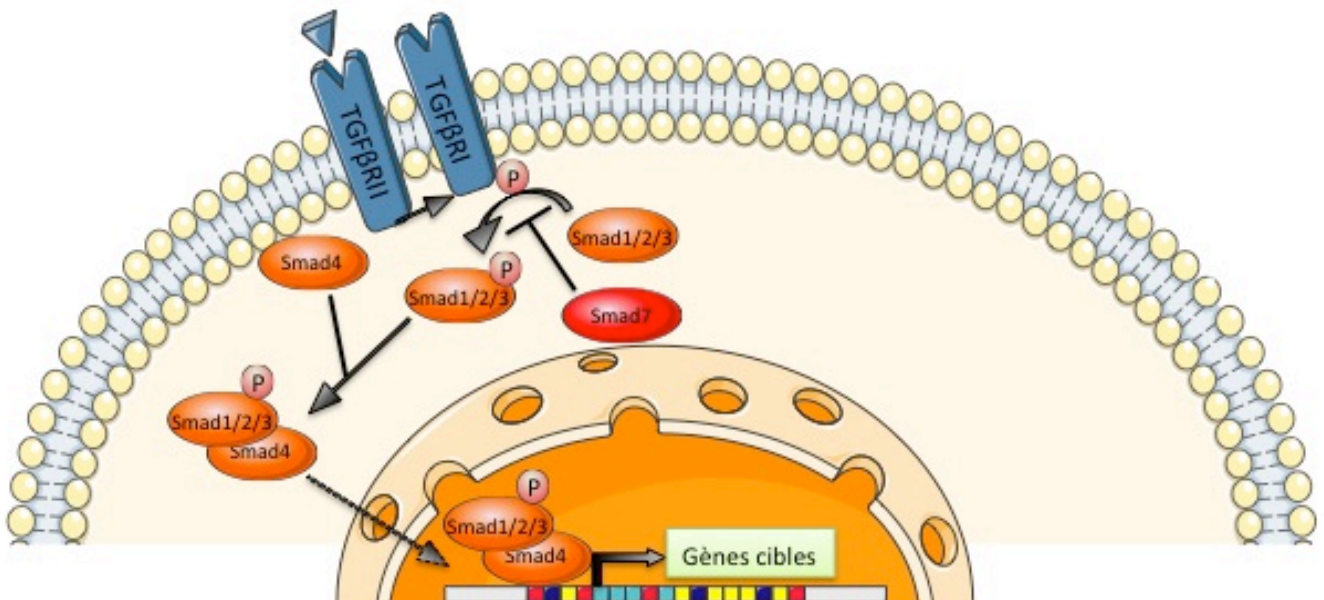


Figure 22: Voie de signalisation de la famille des TGF β

Le TGF β se lie au récepteur de type II du TGF β lequel va phosphoryler le récepteur de type I du TGF β . Le récepteur de type I activé va alors phosphoryler à son tour différentes protéines de la famille des Smads (Smad1/2/3) qui vont alors former un complexe avec Smad4. Ce complexe va être transloqué dans le noyau afin de réguler les gènes cibles du TGF β . Smad7 en interagissant avec le récepteur de type I peut inhiber l'activation des protéines Smad1/2/3 par phosphorylation.

A l'heure actuelle, de nombreuses données ont mis en avant le rôle du TGF β 1 uniquement dans l'évolution de la néphropathie et la rétinopathie diabétique (Figure 23). Aucune donnée n'a encore précisé le rôle des deux autres isoformes dans ces pathologies. L'étude exacte du mécanisme moléculaire du TGF β 1 a révélé que ce facteur de croissance possède la propriété de stimuler plusieurs composants de la MEC et notamment de la MB que sont le collagène I et III pour la MEC et le collagène IV pour la MB (Ziyadeh et al., 1994). Dans le cas du collagène IV, le promoteur du gène codant pour la chaîne α 1 (COL4a1) présente un élément de réponse pour Smad-1 (Abe et al., 2004). En plus d'être à l'origine d'une production excessive de certains composés de la MEC, le TGF β 1

limite également leur dégradation en inhibant l'expression de certaines métalloprotéases et en augmentant l'expression d'inhibiteurs de l'activité de ces enzymes comme les TIMPs ou PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor I) (Kerr et al., 1990; Ogawa et al., 2004; White et al., 2000).

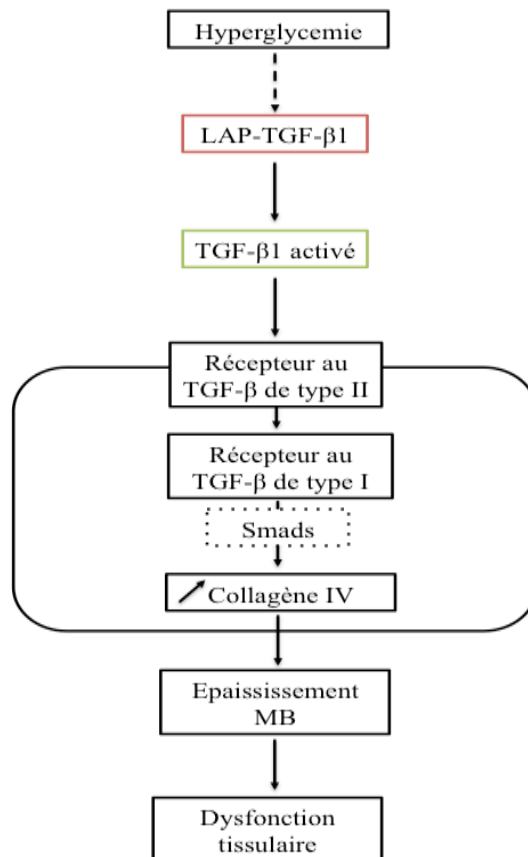


Figure 23 : Voie moléculaire physiopathologique de la néphropathie et de la rétinopathie diabétique médiée par le TGFβ1 (d'après M.S. Garud et Y.A.Kulkarni)

Quant aux deux autres isoformes, il semblerait d'après les quelques données obtenues que l'isoforme 2 contribue à l'action pro-fibrotique du TGF-β1 (Kamath et al., 2015). Le TGF-β3, exprimé essentiellement au cours du développement, participerait quant à lui à la réparation tissulaire également mais non cicatricielle, une caractéristique retrouvée au cours de l'embryogénèse (Ferguson and O'Kane, 2004). Cependant, ces données ne sont que partielles et des précisions seraient nécessaires notamment sur le rôle exact de ces deux isoformes dans la fibrogénèse d'un tissu.

En conclusion, l'ensemble de ces données concernant deux pathologies de la MB induites par l'environnement révèle la complexité des événements à l'origine de ces processus. Certains candidats participant à l'épaississement de la MB soit en tant que composants soit en tant que médiateurs ont néanmoins été mis en évidence et expliqueraient en partie les dysfonctions tissulaires observées dans le rein et la rétine au cours du diabète.

Récemment, l'étude détaillée de la fibrose du TAB au cours de l'obésité par notre laboratoire a mis en évidence la présence de dépôts fibrotiques entourant des adipocytes et les isolant du reste du parenchyme (Divoux et al., 2010). Par ailleurs, d'autres données ont également rapporté une altération de la fonction vasculaire de ce tissu au cours de l'obésité caractérisée par une sénescence endothéliale et la présence au niveau histologique de fibrose entourant les vaisseaux (Pellegrinelli et al., 2014a) (Figure 24). Tous ces éléments suggèrent comme pour la rétinopathie et la néphropathie diabétique un remodelage de la MB de deux types cellulaires du TAB, les adipocytes et les cellules endothéliales. Or peu de données ont été rapportées concernant cette MEC spécialisée dans le TAB. La caractérisation des éléments composant les MB adipocytaires et endothéliales du TA, leur organisation et leur potentiel remodelage au cours de l'obésité constituent donc un champ de recherches à explorer.

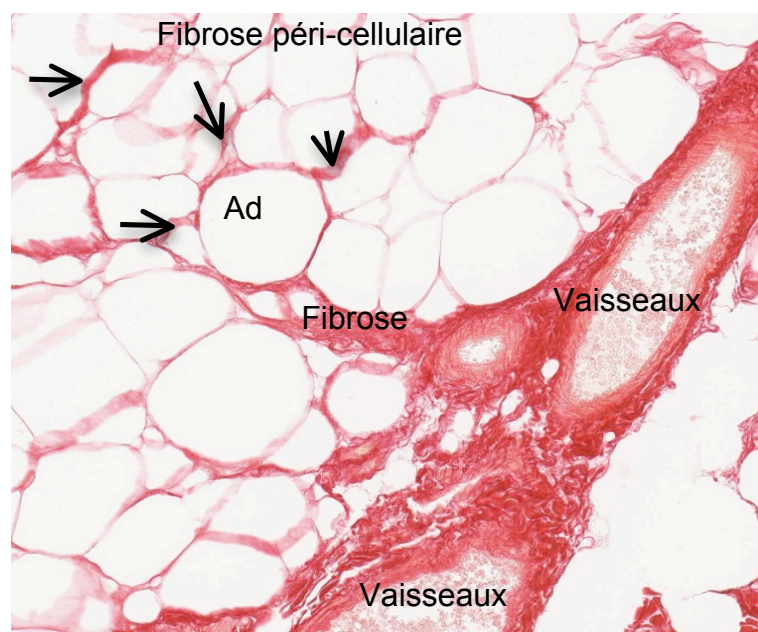


Figure 24: Coupe histologique de biopsie de TAB de sujets obèses Humains coloré au rouge picrosirius (G. Le Naour)

PROJET DE RECHERCHE
ET
RESULTATS

Hypothèse de travail et démarche expérimentale

Ce projet de thèse s'intègre dans l'étude des acteurs impliqués dans la fibrose du Tissu Adipeux Blanc au cours de l'obésité et des complications associées. De nombreuses études ont démontré une altération de la réparation tissulaire au cours de l'obésité. Ce processus physiologique se caractérise par une série d'événements successifs que sont la réponse inflammatoire, angiogénique puis fibrogénique aboutissant *in fine* à la cicatrisation du tissu lésé. L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de bas grade au cours duquel le TAB produit de façon soutenue et continue des cytokines et chimiokines entretenant cette inflammation permanente. Ce phénomène s'accompagne d'une altération fonctionnelle adipocytaire et vasculaire ainsi qu'une accumulation excessive d'éléments de la Matrice Extracellulaire. L'étude détaillée de la fibrose dans le TAB au cours de l'obésité réalisée par notre laboratoire a mis en évidence en particulier la présence de dépôts fibrotiques entourant et isolant les adipocytes appelés fibrose péri-cellulaire (Figure 24). Plusieurs études suggèrent que ces zones fibrotiques péri-cellulaires auraient un impact sur les propriétés métaboliques et sécrétoires des adipocytes. De plus, l'analyse histologique de TAB de sujets obèses a mis en évidence la présence de zones de fibrose autour des vaisseaux sanguins (Figure 24). Au cours de l'obésité, la fonction vasculaire est altérée avec l'acquisition d'un phénotype profibrosant et inflammatoire des cellules endothéliales. Cette dérégulation du système vasculaire dans le cas de l'obésité contribuerait également à une altération des paramètres métaboliques et notamment de la glycémie et de l'insulinémie.

La fibrose du TAB aurait un impact sur les comorbidités associées à l'obésité d'où la nécessité de la quantifier précisément et à plus large échelle afin d'en faire un outil diagnostique et prédictif. En effet, la seule méthode, à l'heure actuelle, utilisée est une technique invasive nécessitant une biopsie du TAB sur laquelle est quantifiée la fibrose par un marquage au rouge picrosirius. Nous décrirons page 107 cette nouvelle technique de mesure non-invasive de la fibrose, développée en collaboration

avec la société Echosens, permettant d'évaluer l'élasticité et la dureté du TAB. Après avoir validé cette technique de mesure non-invasive de la fibrose, nous avons mis en relation les données obtenues sur la fibrose du TAB avec les paramètres cliniques dans un large groupe de sujets obèses morbides.

Mon objectif principal a été d'identifier si une désorganisation de la Membrane Basale du TAB au cours de l'obésité participait au remodelage de la MEC et quelles étaient les conséquences métaboliques de cet événement. En effet, la mise en évidence de dépôts fibrotiques autour des adipocytes et des cellules endothéliales pose la question de la contribution de cette MEC spécialisée dans la fibrose du TAB. Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'avait encore examiné si la Membrane Basale du TAB était modifiée au cours de l'obésité.

Mon hypothèse de travail propose que la fibrose péri-cellulaire présente autour des adipocytes et des cellules endothéliales résulterait en partie d'un épaississement excessif de leur Membrane Basale. Ce remaniement pathologique pourrait alors contribuer au développement de certaines comorbidités associées à l'obésité.

Dans un premier temps, mon approche a été d'identifier certains composants moléculaires majeurs à l'origine des MB adipocytaire et endothéliale dans leur contexte physiologique. Puis à partir de la mise en évidence des éléments majeurs constituant ces deux MEC spécialisées, je me suis attachée à déterminer si leur expression génique évoluait au cours de l'obésité suggérant alors une perturbation dans la structure de la MB du TAB.

Dans un second temps, en me basant sur des données obtenues sur les conséquences du remodelage pathologique de la MB d'autres tissus, j'ai voulu estimer si cette désorganisation structurelle pouvait être associée à certaines complications métaboliques caractéristiques de l'obésité. Sur deux groupes de sujets obèses distincts, j'ai évalué les relations possibles entre l'expression d'un composé majeur de la MB, le collagène IV, et les différents paramètres biocliniques chez ces patients.

Enfin, je me suis concentrée sur un facteur de croissance pro-fibrosant, le TGF β connu pour son action sur l'expression du collagène IV dans d'autres types cellulaires. Ainsi, en traitant des cellules endothéliales et des adipocytes isolés du TAB, j'ai évalué l'incidence que pouvait avoir le TGF β sur l'expression du collagène IV dans ces deux types cellulaires.

Résultats étude n°1 : Relation entre fibrose et rigidité du TAB chez des sujets obèses morbides : association avec le diabète

- Abdenmour M, Reggio S, Le Naour G, Liu Y, Poitou C, Aron-Visnewsky J, Charlotte F, Bouillot JL, Torcivia A, Sasso M, Miette V, Zucker JD, Bedossa P, Tordjman J and Clément K. *Association of Adipose Tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity : links with diabetes and BMI loss after gastric bypass*. J Clin Endocrinol Metab. 2014 March ; 99(3) :898-907.

Jusqu'à présent la coloration au rouge picrosirius de sections de biopsies de TAB et de foie restait la technique de référence pour quantifier la fibrose. Ce type de marquage colorant en rouge de manière spécifique les collagènes fibrillaires est un bon outil pour la visualisation des dépôts fibrotiques formés en grande partie par ce type de collagène (Grimm et al., 2003; Whittaker et al., 1994). Néanmoins, notre laboratoire dans une étude publiée en 2009 a soulevé la question de la pertinence de cette technique de quantification de la fibrose dans le TAB (Divoux et al., 2010). En effet contrairement au tissu hépatique, le TAB est un tissu volumineux et extrêmement hétérogène. Par conséquent, le prélèvement d'une biopsie réalisée à l'aiguille ne peut pas refléter à lui seul la distribution de la fibrose dans la totalité du tissu.

A partir de ce constat, le laboratoire en s'associant avec une entreprise (Echosens) spécialisée dans le diagnostic non-invasif de la fibrose a développé un nouvel outil mesurant l'élasticité du TAB nommé AdiposcanTM. Cette technique se base sur la même technologie que le fibroscanTM estimant la fibrose hépatique. En utilisant ce dispositif, l'objectif de l'étude a été à partir de l'estimation de la rigidité du TAB d'évaluer les relations entre le remodelage pathologique de ce tissu et les paramètres cliniques et métaboliques de sujets obèses morbides. **Ce travail a donné lieu à une publication dans Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (cf p109).**

Dans ce travail, mon rôle a été de quantifier la fibrose totale et la fibrose péri-cellulaire dans le TAsc et le TAv par la technique du rouge picrosirius dans une cohorte de 404 sujets obèses morbides. Cette

technique de mesure de la fibrose dans le TAB a permis de valider dans un premier temps la mesure de la rigidité du TAB par l'adiposcan. En effet, nous démontrons que la fibrose du TAB mesuré par IHC est associée à la mesure physique de la rigidité par le nouvel outil. Suite à la validation de cet outil comme une technique de mesure appropriée, nous avons alors démontré sur la cohorte que la rigidité du TAB chez des sujets obèses était associée à l'insulinémie et la glycémie à jeun ainsi qu'à l'Hb1Ac (hémoglobine glyquée, un marqueur du diabète). De plus, cette étude a alors mis en évidence que les sujets obèses diabétiques présentaient une rigidité du TAB plus importante que les individus obèses non-diabétiques. Néanmoins, un élément intrigant ressort de cette étude. Malgré l'association existante entre la mesure de la rigidité avec la quantification de la fibrose du TAB au rouge picrosirius, aucune corrélation n'est retrouvée entre la quantification de la fibrose et les paramètres cliniques des patients. Ces données suggèrent que d'autres éléments que les collagènes fibrillaires modifieraient l'élasticité du TAB.

L'une des hypothèses est que la rigidité du tissu ne serait pas la cause uniquement d'une accumulation excessive des collagènes fibrillaires mais également d'une altération des fibres élastiques constituant le TAB. En effet dans une étude publiée en 2011, les auteurs démontraient une diminution du marquage à l'élastine dans le TAsc de sujets obèses (Spencer et al., 2011). Le constat le plus intéressant dans cette étude était que les fibres élastiques dans le TAB de sujets obèses semblaient altérées formant des brins courts. Par conséquent, ces données obtenues chez l'Humain semblent suggérer un rôle également des fibres élastiques dans la fibrose du TAB au cours de l'obésité.

Association of Adipose Tissue and Liver Fibrosis With Tissue Stiffness in Morbid Obesity: Links With Diabetes and BMI Loss After Gastric Bypass

Meriem Abdenmour, Sophie Reggio, Gilles Le Naour, Yuejun Liu, Christine Poitou, Judith Aron-Wisnewsky, Frederic Charlotte, Jean-Luc Bouillot, Adriana Torcivia, Magali Sasso, Veronique Miette, Jean-Daniel Zucker, Pierre Bedossa, Joan Tordjman,* and Karine Clement*

Context: Liver and white adipose tissue (WAT) develop inflammation and fibrosis.

Objective: The aim of the study was to evaluate the bioclinical relevance of WAT fibrosis in morbid obesity and diabetes and the relationships with tissue stiffness measured using a novel device.

Design and Setting: Observational and longitudinal studies were conducted in a hospital nutrition department.

Patients: Biopsies of liver and subcutaneous WAT (scWAT) and omental adipose tissue were collected from 404 obese bariatric surgery candidates, of whom 243 were clinically characterized before surgery and 3, 6, and 12 months after surgery. In 123 subjects, liver and scWAT stiffness was assessed noninvasively using vibration-controlled transient elastography (VCTE).

Interventions: Bariatric surgery was performed for some patients.

Main Outcome Measure: Adipose tissue fibrosis and stiffness and their link to obesity phenotypes were measured.

Results: scWAT fibrosis was positively associated with liver fibrosis (fibrosis score ≥ 2) ($\rho = 0.14$; $P = .01$). VCTE-evaluated liver and scWAT stiffness was positively correlated with immunohistochemistry-determined liver ($\rho = 0.46$; $P = .0009$) and scWAT fibrosis ($\rho = 0.48$; $P = .0001$). VCTE-evaluated scWAT stiffness measures negatively associated with dual-energy x-ray absorptiometry-evaluated body fat mass ($R = -0.25$; $P = .009$) and were correlated with metabolic variables. Diabetic subjects showed increased scWAT stiffness. Participants less responsive to gastric bypass were older and more frequently diabetic, and they had increased body mass index, serum IL-6, and scWAT and liver fibrosis. Subjects with no diabetes and normal liver had higher fat mass and lower tissue fibrosis and stiffness.

Conclusion: scWAT stiffness was associated with tissue fibrosis, obesity, and diabetes-related traits. Noninvasive evaluation of scWAT stiffness might be useful in clinical practice. (*J Clin Endocrinol Metab* 99: 898–907, 2014)

One hallmark of obesity development and progression is tissue remodeling, particularly inflammation and increased fibrosis of liver and white adipose tissue (WAT). Liver fibrosis results from the gradual progression of liver injuries over time and can be a component of nonalcoholic

fatty liver diseases (1). Although causal determinants are not well understood, liver fibrosis in obesity is associated with clinical and biological features, including age, insulin resistance, diabetes (2, 3), low-grade inflammation (elevated IL-6 and TNF α) (4, 5), gender (6), and ethnicity (7).

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2014 by the Endocrine Society

Received August 23, 2013. Accepted December 9, 2013.

First Published Online January 7, 2014

* K.C. and J.T. contributed equally to this work.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CI, confidence interval; DXA, dual-energy x-ray absorptiometry; F, liver fibrosis score; GR, good responder; γ GT, γ -glutamyl transpeptidase; HbA1C, glycosylated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; IHC, immunohistochemistry; LR, less responsive; OR, odds ratio; oWAT, omental WAT; scWAT, subcutaneous WAT; VCTE, vibration-controlled transient elastography; WAT, white adipose tissue.

Liver fibrosis is also correlated with changes in tissue stiffness, which can be detected by noninvasive elastography (8). Macrophage accumulation in visceral WAT deposits is associated with aggravated liver inflammation and fibrosis in morbid obesity (9).

Recent data have shown associations between human obesity and major changes in the expressions of extracellular matrix components in WAT (10–13), accompanied by increased collagen depots and more collagen types, such as collagen I, III, and VI (11). Although excess collagen is linked with insulin resistance (13, 14), no study has reported details of the relationship between WAT collagen accumulation and potential changes in WAT stiffness, as observed in the liver. Moreover, a putative link between liver and WAT fibrosis has never been described in the context of obesity and diabetes (13). Thus, it remains unclear whether adipose tissue stiffness is associated with obesity-related variables and metabolic risks.

Reducing body weight leads to improvements in metabolic, liver, and cardiovascular complications (15), as well as ameliorations in WAT alterations, such as inflammation (10, 16). Diabetes improves after bariatric surgery-induced weight loss, which is currently the most efficient procedure for morbid obesity, but which has its own associated risks (17–19). Variability among individuals and weight regain remain major challenges (20, 21), with weight outcome failures occurring in about 30% of subjects after surgery (22). Putative predictors of weight loss include clinical and individual variables, such as gender, age, history of diabetes, and genetic and psychological traits (23, 24).

Little is known about the relevance of tissue structure alterations in the context of weight loss after gastric bypass. In a preliminary study with a small subject group (11), we showed that higher fibrosis around adipocytes (ie, periadipocyte fibrosis) is associated with reduced fat mass loss after gastric bypass. However, the predictive capacity of this putative tissue marker was not evaluated in combination with biochemical variables and tissue alterations (11).

The present study examined morbidly obese subjects to determine the biochemical relevance of WAT and liver fibrosis as evaluated by immunohistochemistry (IHC), as well as the relationships between IHC-evaluated fibrosis,

tissue stiffness measured using a novel device, and biochemical parameters.

Patients and Methods

Study samples

This study enrolled 404 obese subjects who had been prospectively included in a gastric surgery program at the nutrition departments of the Hôtel-Dieu and Pitié-Salpêtrière hospitals (Paris, France), as described elsewhere (25, 26). During surgery, paired surgical sc and omental WAT (scWAT and oWAT, respectively) and liver biopsies were collected. A total of 139 subjects (34.4%) had type 2 diabetes, indicated by fasting glycemia of >7 mM or use of antidiabetic treatment. Of these diabetic subjects, 33 (23.7%) were untreated, 42 (30.2%) took metformin, 39 (28.1%) used insulin, and 25 (18%) used a combination of different treatments. Of the 404 study participants, 91 (22.5%) were taking hypolipidemic drugs (fibrates or statins).

Additionally, 59 subjects had undergone gastric banding ranging from a few months to 5 years before undergoing gastric bypass; these patients were referred to as the conversion group. The 345 primarily operated subjects were weight-stable for at least 3 months before gastric bypass. This group included 49 women (14.2%) who were considered metabolically healthy, having no diabetes or liver alterations (ie, no steatosis, inflammation, or fibrosis). The cohort did not include any healthy nondiabetic men. Table 1 shows the clinical and biological parameters of the participants. Among the 345 subjects evaluated at baseline, 243 were followed up at 3, 6, and 12 months after bypass surgery (Table 1). The Ethics Committee at Hôtel-Dieu Hospital approved the present clinical investigations. All subjects gave their informed, written consent before inclusion in the study.

Liver histopathology

Liver biopsies were formalin-fixed and paraffin-embedded, and serial sections were stained. The minimum set of stained sections included hematoxylin-eosin, picrosirius red, and Perls' staining. Biopsies were reviewed by a single liver pathologist (B.P.). Among the 345 patient samples, liver scoring for one patient could not be performed due to the poor quality of the liver biopsy; for the remaining 344 patients, fibrosis was scored at baseline according to Kleiner criteria (27).

WAT histopathology

scWAT and oWAT biopsies were processed, embedded in paraffin, and sliced into 5- μ m-thick sections. Adipocyte diameters were evaluated using hematoxylin-eosin staining and Perfect Image software (Claravision). WAT biopsy slides were stained with picrosirius red, and the total area was scanned at 20 \times magnification and resolution of 0.24 μ m/pixel using a Na-

Institute of Cardiometabolism and Nutrition (M.A., S.R., Y.L., C.P., J.A.-W., J.-D.Z., J.T., K.C.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France; INSERM, U872 (M.A., S.R., Y.L., C.P., J.A.-W., J.-D.Z., J.T., K.C.), Nutrimique, 75006 Paris, France; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 (M.A., S.R., Y.L., C.P., J.A.-W., J.-D.Z., J.T., K.C.), Centre de Recherche des Cordeliers, Unité Mixte de Recherche S 872, 75006 Paris, France; Echoscans (M.A., Y.L., M.S., V.M.), Research and Development Department, 75013 Paris, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (G.L.N., F.C.), Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Liver Center, 75006 Paris, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (J.-L.B.), Ambroise Paré Hospital, Surgery Department, 92100 Boulogne-Billancourt, France; Institut de Recherche et Développement (J.-D.Z.), Unité Mixte Internationale 209, Unité de Modélisation Mathématique et Informatique de Systèmes Complexes, Institut de Recherche pour le Développement, IRD, 93143 Bondy, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (P.B.), Beaujon Hospital, Pathology Department, 92118 Clichy, France; Centre de Recherche Bichat-Beaujon (P.B.), INSERM, U773, University Paris-Diderot, 92100, Boulogne-Billancourt, France; and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (A.T.), Chirurgie digestive et hépato-bilio-pancréatique, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France

Table 1. Characteristics of the Study Population

Variables	At Baseline (Before Bypass, n = 345)	Kinetic Studies (n = 243)			
		Before Bypass	3 mo After Bypass	6 mo After Bypass	1 y After Bypass
Age, y	42 (12)	42 (12)	42 (12)	42 (12)	43 (12)
BMI, kg/m ²	47.9 (7.4)	48.2 (7.0)	40.0 (6.5)	36.4 (6.4)	33.2 (6.4)
Body weight, kg	132.5 (25.34)	133.8 (23.2)	110.9 (20.5)	100.8 (20.0)	92.1 (19.8)
Total body fat mass, %	46.79 (5.69)	46.46 (5.55)	43.57 (5.92)	40.15 (6.39)	36.14 (7.12)
Diabetes status, n (%)	123 (35.7)	86 (35.4)	43 (17.6)	37 (15.2)	32 (13.2)
Fasting glycemia, mM	6.34 (2.36)	6.40 (2.50)	5.17 (1.28)	4.89 (0.95)	4.82 (0.77)
Fasting insulin, μ U/mL	23.31 (37.54)	24.71 (42.98)	10.71 (6.3)	8.15 (4.85)	7.56 (6.55)
HbA1C, %	6.51 (1.3)	6.52 (1.36)	5.82 (1.35)	5.63 (0.57)	5.59 (0.56)
HOMA-IR	7.62 (22.07)	8.35 (25.89)	2.5 (1.85)	1.81 (1.3)	1.68 (1.84)
Triglycerides, mM	1.64 (1.3)	1.62 (1.41)	1.24 (0.56)	1.1 (0.48)	0.95 (0.42)
Cholesterol, mM	4.85 (1.03)	4.80 (1.03)	4.32 (0.88)	4.30 (0.85)	4.36 (0.82)
HDL cholesterol, mM	1.21 (0.34)	1.21 (0.35)	1.15 (0.33)	1.28 (0.39)	1.51 (0.4)
AST, IU/L	28.46 (12.44)	28.86 (13.0)	29.95 (15.48)	24.59 (7.12)	25.46 (8.79)
ALT, IU/L	36.24 (30.4)	37.32 (33.48)	36.46 (26.64)	26.17 (18.84)	27.44 (23.69)
γ GT, mg/dL	50.15 (51.02)	50.65 (50.24)	29.81 (44.67)	27.08 (37.82)	26.17 (32.49)
Leptin, ng/mL	53.02 (24.88)	52.08 (23.44)	27.2 (15.57)	21.68 (13.32)	18.55 (14.08)
Adiponectin, μ g/mL	5.71 (3.41)	5.61 (3.38)	6.65 (4.06)	7.79 (5.33)	9.01 (5.86)
IL-6, pg/mL	4.23 (3.44)	4.35 (3.45)	5.97 (15.45)	6.48 (18.77)	4.34 (14.12)
hsCRP, mg/dL	0.97 (0.85)	0.97 (0.82)	0.56 (0.63)	0.43 (0.52)	0.23 (0.56)

Abbreviations: hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; HOMA-IR, homeostasis model of assessment-insulin resistance. Data are expressed as mean (SD) unless otherwise stated; n = 243 is a subset of the larger group; n = 345 at baseline before bypass.

noZoomer Hamamatsu scanner (Hamamatsu Photonics KK, Systems Division). Digital slides were visualized on a high-definition display (Barco Coronis Fusion; Barco) to pinpoint pathological fibrosis quantification (termed “IHC-fibrosis” below). Detection thresholds were adjusted with an image-analysis module using Calopix software (Tribvn). Total IHC-fibrosis quantification was expressed as the ratio of fibrous tissue area stained with picosirius red to the total tissue surface, as previously described (10). Periadipocyte IHC-fibrosis was quantified by measuring the area of IHC-fibrosis in 10 random fields examined at 10 \times magnification (11). IHC-fibrosis quantification was performed on one section, and we verified that this slide was representative of the whole biopsy by quantifying 10 slides from the start to the end of the biopsy specimen. Results indicated that this quantification was homogeneous. This technique is routinely used to quantify liver fibrosis.

Bioclinical tests

Body composition was estimated by whole-body fan-beam dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) scanning (Hologic Discovery W software, version 12.6; Hologic Inc) (28). Body fat and lean mass distribution were determined as described elsewhere (29). Thirty-four subjects were excluded because their preoperative weight exceeded the limit of the DXA (160 kg) or they did not fit entirely within the DXA field of view. Blood samples were taken after 12 hours of overnight fasting. Clinical variables were measured 1 month before the day of bariatric surgery as described elsewhere (9–11, 16). For 243 subjects, DXA measurements were taken before bypass and at 3, 6, and 12 months after bypass.

Measurement of tissue stiffness by transient elastography

In 123 subjects, liver stiffness was noninvasively assessed using the vibration-controlled transient elastography (VCTE) de-

vice (Fibroscan; Echosens) (30). Using the same principle that the VCTE uses for liver assessment, Echosens customized a novel prototype device called AdipoScan to measure scWAT stiffness in the same 123 obese subjects. The VCTE technology is based on the generation of a mechanical vibration, which induces the propagation of a shear wave in the tissue. The shear wave velocity is evaluated in the scWAT region of interest, which is anisotropic and heterogeneous and is related to tissue viscoelastic characteristics. The velocity increases with tissue stiffness. Using this new prototype, measurements were performed, localized near the umbilicus on the subject because abdominal scWAT was at its maximum thickness at this position. In that case, it is based on the use of a mini electromechanical transducer for generating the mechanical vibration, associated to a piezoelectric transducer for following the shear wave propagation (see Figure 2B). Importantly, this prototype is light to minimize the initial static force (pressure), and then to avoid compressing the tissue and modifying the viscoelastic properties of the WAT (see Figure 2B).

The intraoperator reproducibility was evaluated in five patients using the standardized coefficient of variation (SCV). AdipoScan measurements were reproducible (SCV = 4%).

Tissue stiffness by transient elastography was measured 1 month before the day of bariatric surgery.

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm SD. Categorical variables are expressed as numbers and percentages. The Shapiro-Wilk test was used to test the Gaussian distribution of the biological parameters. Skewed variables were log-transformed to normalize their distribution before statistical analyses. Categorical data were analyzed using the χ^2 test or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous data were analyzed with Student's *t* test or Wilcoxon's test, as appropriate. Correlation analyses were per-

Table 2. Comparison of Clinical and Biological Parameters at Baseline Between Patients With and Without Significant Liver Fibrosis

	Patients Without Significant Liver Fibrosis (F < 2)	Patients With Significant Liver Fibrosis (F ≥ 2)	P Value
n (%)	259 (75.3)	85 (24.7)	
Variables			
Female, n (%)	218 (84.1)	55 (64.7)	<.001
Age, y	42 (12)	43 (12)	.48
BMI, kg/m ²	47.43 (7.12)	49.28 (8.14)	.063
Total body fat mass, %	49.30 (5.21)	48.36 (5.04)	.25
Diabetes status, n (%)	75 (28.9)	47 (55.3)	<.001
Glycemic parameters			
Fasting glycemia, mM	6.01 (2.09)	7.34 (2.84)	<.001
Fasting insulin, μU/mL	21.69 (39.08)	28.49 (32.14)	.001
HbA1C, %	6.33 (1.21)	7.12 (1.40)	<.001
Lipid parameters			
Triglycerides, mM	1.56 (1.37)	1.87 (1.01)	.003
HDL cholesterol, mM	1.23 (0.36)	1.14 (0.30)	.026
Cholesterol, mM	4.90 (1.04)	4.69 (1.00)	.101
ApoA1, mM	1.38 (0.28)	1.29 (0.22)	.005
ApoB, mM	0.98 (0.28)	0.93 (0.28)	.28
Hepatic factors			
AST, IU/L	26.97 (10.10)	33.01 (17.25)	.003
ALT, IU/L	32.22 (19.28)	48.79 (49.74)	<.001
γGT, IU/L	42.87 (41.33)	73.23 (69.24)	<.001
Adipokines			
Leptin, ng/mL	52.79 (24.89)	53.73 (24.97)	.77
Adiponectin, μg/mL	5.77 (3.5)	5.53 (3.13)	.55
IL-6, pg/mL	4.02 (3.25)	4.89 (3.92)	.003
hsCRP, mg/dL	0.95 (0.93)	1.06 (0.81)	.050
Adipose-tissue fibrosis			
scWAT fibrosis, %	4.20 (4.77)	5.25 (4.83)	.018
Pericellular scWAT fibrosis, %	0.29 (0.41)	0.38 (0.49)	.052
oWAT fibrosis, %	4.16 (3.08)	4.55 (3.35)	.36

Abbreviations: hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; Apo, apolipoprotein. Values are expressed as means (SD), unless otherwise stated. Parametric *P* values were obtained from Student's *t* test on log-transformed data or the χ^2 test for qualitative data. All parameters are at T0.

formed using Spearman's or Pearson's correlation, as appropriate. Univariate/multivariate logistic regression analyses were performed, and each odds ratio (OR) was calculated with a 95% confidence interval (CI).

For clustering analysis of patients' body mass index (BMI) losses after bariatric surgery, we used the K-means algorithm, which is specifically designed to deal with longitudinal data (KmL) (31). The KmL method is the implementation of "k-means" specifically designed to cluster trajectories. This method proposes a graphical interface for choosing the "best" number of clusters. Thus, the classification (low vs good responders to bariatric surgery) was based on the resulting observation. All *P* values are two-sided, and *P* values <.05 were considered to be statistically significant. All analyses were performed using R software, version 2.15.1.

Results

Association between WAT and liver IHC-determined fibrosis

Among the 404 initially recruited subjects, 59 underwent a bypass conversion that was prescribed due to

weight regain after the first gastric banding. scWAT IHC-fibrosis accumulation significantly differed in primarily operated subjects (4.5%) compared to those with bypass conversion (8.1%; *P* = .004); therefore, the bypass conversion group was excluded from subsequent analysis.

Our findings confirmed that, among the investigated obese subjects for whom liver fibrosis score (F) was available, those with significant liver fibrosis (*n* = 85; *F* ≥ 2) were more frequently men, had higher rates of type 2 diabetes and dyslipidemia, and had elevated circulating IL-6 levels compared to the subjects with *F* < 2. Additionally, subjects with significant liver fibrosis exhibited increased total scWAT IHC-fibrosis (Table 2). Significant liver fibrosis (*F* ≥ 2) was positively associated with both scWAT total (ρ = 0.14; *P* = .012) and periadipocyte IHC-fibrosis (ρ = 0.11; *P* = .044). The amount of total IHC-fibrosis in scWAT was associated with oWAT IHC-fibrosis (ρ = 0.34; *P* < .001), but no correlation was found between oWAT and liver fibrosis. When we excluded diabetic participants (35.6% of the population at baseline), we ob-

Table 3. Clinical and Biological Parameters at Baseline Between Nondiabetic Women Without Liver Disease (Healthy Liver) and With Significant Liver Fibrosis ($F \geq 2$)

	Healthy Liver (n = 49)	F ≥ 2 (n = 27)	P Value
Variables			
Age, y	36 (11)	36 (9)	.041
Body weight, kg	128 (19)	131 (22)	.28
BMI, kg/m ²	46.6 (5.7)	49.5 (8.4)	.57
Total body fat mass, %	49.38 (4.87)	47.27 (3.96)	.024
Glycemic parameters			
Fasting glycemia, mm	5.07 (0.56)	5.32 (0.62)	.089
Fasting insulin, μ U/mL	13.35 (7.03)	20.5 (11.99)	.005
HbA1C, %	5.73 (0.38)	5.81 (0.51)	.68
HOMA-IR	3.03 (1.66)	4.96 (3.28)	.004
Lipid parameters			
Triglycerides, mm	1.24 (0.68)	1.34 (0.83)	.66
Cholesterol, mm	5.04 (0.98)	4.69 (0.78)	.122
HDL cholesterol, mm	1.33 (0.39)	1.3 (0.31)	.99
Hepatic factors			
AST, IU/L	24.12 (7.43)	26.28 (7.99)	.157
ALT, IU/L	25.49 (15.7)	33.58 (17.52)	.049
γ GT, mg/dL	36.47 (42.58)	41 (33.87)	.25
Adipokines			
Leptin, ng/mL	66.18 (28.69)	66.12 (25.23)	.89
Adiponectin, μ g/mL	6.95 (4.57)	6.61 (3.17)	.93
IL-6, pg/mL	3.19 (1.77)	4.11 (2.36)	.052
hsCRP, mg/dL	0.98 (0.93)	1.1 (0.78)	.157
Adipose-tissue fibrosis			
scWAT fibrosis, %	3.96 (3.62)	6.01 (4.85)	.034
oWAT fibrosis, %	4.65 (4.61)	5.78 (2.99)	.026
Pericellular scWAT fibrosis, %	0.29 (0.39)	0.27 (0.33)	.62
Pericellular oWAT fibrosis, %	0.36 (0.5)	0.46 (0.51)	.31

Abbreviations: hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; HOMA-IR, Homeostasis Model of Assessment–insulin resistance. Values are expressed as means (SD). P values obtained from Wilcoxon's test or Fisher's tests for qualitative data. All parameters are at T0.

served a positive correlation between significant liver fibrosis ($F \geq 2$) and both total scWAT ($\rho = 0.15$; $P = .029$) and oWAT IHC-fibrosis ($\rho = 0.14$; $P = .039$).

In these 344 subjects, we further examined circulating metabolic and inflammatory variables that were potentially associated with WAT IHC-fibrosis at baseline. In contrast to our observations relating to liver fibrosis, we found no significant associations between WAT IHC-fibrosis and glucose or lipidic parameters. We only observed a significant association between scWAT IHC-fibrosis and circulating concentrations of IL-6 ($\rho = 0.12$; $P = .033$).

WAT IHC-fibrosis negatively associated with body fat mass

At baseline, scWAT IHC-fibrosis was negatively associated with the percentage of fat mass ($\rho = -0.17$; $P = .003$), and oWAT IHC-fibrosis was negatively correlated with weight ($\rho = -0.14$; $P = .010$) and BMI ($\rho = -0.12$; $P = .022$). Compared to women ($n = 27$) with significant liver fibrosis ($F \geq 2$), the subgroup of 49 women with no

diabetes and no liver alterations showed higher body fat mass ($P = .024$) but less IHC-fibrosis in both scWAT ($P = .034$) and oWAT ($P = .026$) (Table 3).

Tissue IHC-fibrosis associated with BMI reduction after gastric bypass

The group of 243 subjects prospectively followed after bariatric surgery showed major improvements in mean BMI, DXA-evaluated fat mass, and metabolic and inflammatory variables (Table 1). Use of the KmL method (31) to cluster the BMI trajectories after gastric bypass revealed three main groups of BMI loss: a less responsive (LR) group with a BMI loss of $<25\%$ ($n = 70$), and those with good ($n = 119$) or very good ($n = 54$) weight loss (Figure 1A). These latter two groups had a combined mean BMI reduction of 34.8% and were collectively termed good responders (GR). At 1 year after surgery, the LR group showed less improvement in body fat mass, diabetes status, and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol compared to the GR group (Supplemental Table 1, published

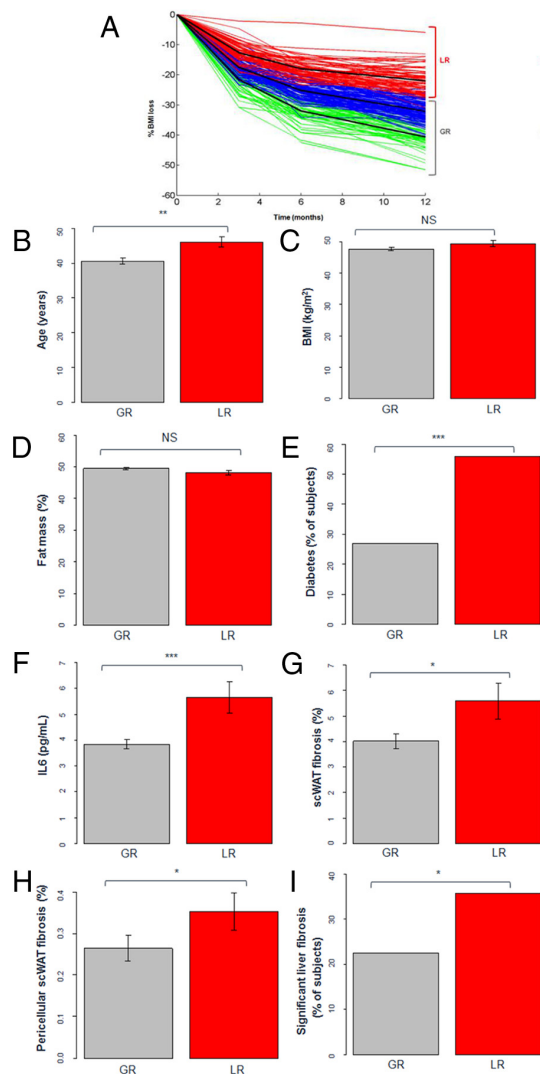


Figure 1. Baseline comparison between low and good responders to bariatric surgery-induced weight loss. A, Clustering of weight-loss profiles in 243 obese subjects: red, low responders to weight loss (LR); blue, good responders; green, very good responders. For further analyses, the good responders and very good responders are combined and referred to as good responders (GR). B–I, Baseline comparison between LR (n = 70) and GR (n = 173) groups in regards to age (B), BMI (C), DXA-evaluated fat mass (D), diabetes state (E), IL-6 circulating concentration (F), percentage scWAT IHC-fibrosis (G), percentage pericellular scWAT IHC-fibrosis (H), and liver fibrosis (F ≥ 2) (I). Data are expressed as mean ± SEM, or as percentage for diabetes and liver fibrosis. The *P* values were obtained using Student's *t* test on log-transformed data or the χ^2 test for qualitative data. NS, *P* > .05; *, *P* < .05; **, *P* < .01; ***, *P* < .001.

on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>.

Examination of the clinical and biological characteristics of the LR vs GR groups at baseline showed that the LR group was older, had a higher frequency of diabetes, and had increased circulating IL-6 concentrations, whereas mean baseline BMI and fat mass were similar in both

groups (Figure 1, B–F, and Supplemental Table 2). Compared to the GR group, the LR group also had increased scWAT IHC-fibrosis (both total and periadipocyte fibrosis; Figure 1, G and H), and exhibited more significant liver fibrosis (Figure 1I and Supplemental Table 2). Interestingly, the 49 women with no liver alteration were more likely to be good responders after surgery (Table 3) with only four (13.7%) in the LR group, whereas 45 (86.3%) were in the GR group. This comparison could not be made in men, in whom no healthy livers were found.

Overall, the LR group was associated with diabetes status, age, fasting glycemia, glycosylated hemoglobin (HbA1C), IL-6, and binarized baseline BMI (1 for BMI ≥ 55, 0 for BMI < 55), as well as with total and pericellular IHC-fibrosis in scWAT (Table 4). Adjusting for age, diabetes, and IL-6 did not alter these associations. Regarding liver injury, the ORs increased with the severity of fibrosis score; OR values were 2.24 [95% CI, 1.09–4.60] for minimal fibrosis (F1), 2.50 [95% CI, 1.10–5.68] for significant fibrosis (F ≥ 2), and 6.48 [95% CI, 1.94–21.6] for severe fibrosis (F ≥ 3).

Physical measures of WAT stiffness associated with WAT IHC-fibrosis and dysregulation of glucose homeostasis

Liver fibrosis is associated with changes in tissue stiffness, which can be physically measured (29). To explore the possibility of a similar association with WAT IHC-fibrosis, we developed a new ultrasonic tool to measure shear-wave velocity in scWAT. Using this tool, we assessed tissue stiffness in 123 subjects (Figure 2, A and B), of whom 49 and 61 subjects, respectively, were also subjected to liver staging and adipose tissue IHC-fibrosis quantification.

First, we found that the shear-wave velocity of scWAT was positively correlated with liver stiffness (*R* = 0.3; *P* =

Table 4. Parameters Associated With the LR Group

Parameters	OR [95% CI]
Diabetes status	3.37 [1.90–6.00]
Age	1.05 [1.01–1.07]
Fasting glycemia	1.18 [1.06–1.33]
HbA1C	1.58 [1.25–1.99]
IL-6	1.18 [1.06–1.31]
BMI binarized at baseline (1 for BMI ≥ 55, 0 for BMI < 55)	1.45 [1.06–1.98]
Total scWAT fibrosis	1.45 [1.06–1.98]
Adjusted for age, diabetes, and IL-6	1.58 [1.10–2.28]
Pericellular scWAT fibrosis	1.29 [1.04–1.62]
Adjusted for age, diabetes, and IL-6	1.38 [1.07–1.79]

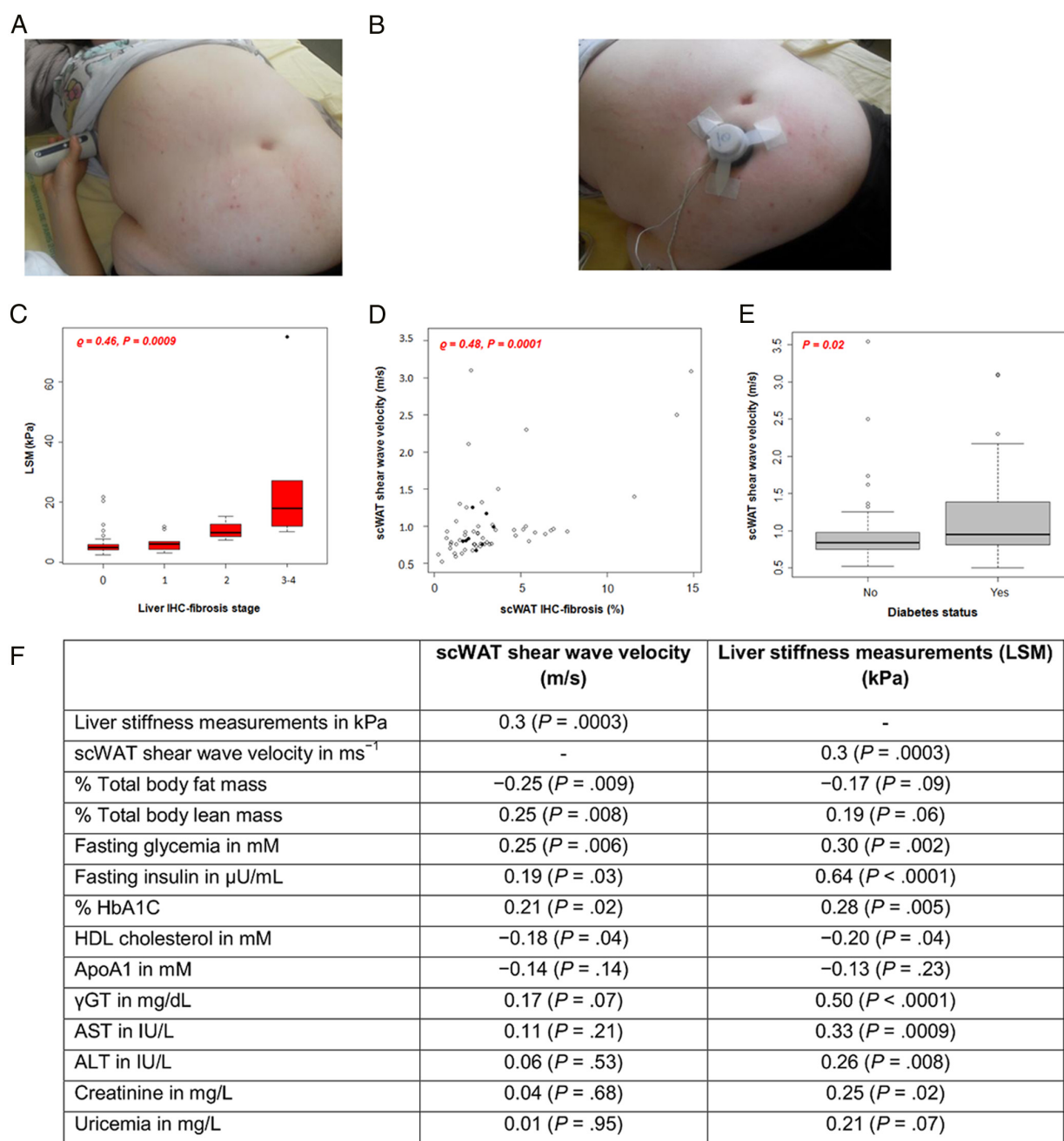


Figure 2. Physical measures of scWAT and liver stiffness. A, Evaluation of liver stiffness measurements (LSM) using a Fibroscan XL probe. B, Area of measurement of shear-wave velocity in scWAT. C, Box-plot of LSM (kPa) according to stage of liver fibrosis in 49 subjects; 63.3% ($n = 31$) had a liver score of F0, 20.4% ($n = 10$) had F1, 6.1% ($n = 3$) had F2, 8.2% ($n = 4$) had F3, and 2% ($n = 1$) had F4 (solid dot). The only patient with the F4 stage of liver fibrosis also had the higher level of liver stiffness (75 KPa). D, Correlation analysis between shear-wave velocity in scWAT and percentage of scWAT IHC-fibrosis ($n = 61$ subjects). Filled circles represent eight women with no liver alterations and no diabetes. E, Box-plot of shear-wave velocity in scWAT (m/s) according to the diabetic status of 123 subjects; 42.3% ($n = 52$) had type 2 diabetes. F, Correlation analysis between shear-wave velocity in scWAT and liver stiffness measurements and clinical characteristics in morbidly obese subjects. Spearman's correlations were used in panels C and D, Student's t test was used in panel E, and Pearson's correlations were used in panel F.

.0003), which itself was positively associated with the fibrosis liver stage ($\rho = 0.46$; $P = .0009$; $n = 49$; Figure 2C).

Second, we observed that scWAT shear-wave velocity was positively associated with scWAT IHC-fibrosis ($\rho = 0.48$; $P = .0001$; $n = 61$; Figure 2D). In this group, non-diabetic obese women with no liver alterations also showed lower scWAT shear-wave velocity ($P = .02$), in agreement with their decreased adipose tissue IHC-fibrosis (Figure 2D, solid dots).

Third, in the 123 examined subjects, the shear-wave velocity of scWAT was correlated positively with several biochemical parameters, including fasting glycemia and insulin, HbA1C, and fat-free mass, and negatively with body fat (%) and HDL cholesterol (Figure 2F). Diabetes status ($n = 52$, 42.3%) was also significantly associated with increased shear-wave velocity ($P = .022$) (Figure 2E). Similarly, liver stiffness was found to correlate positively with circulating creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyl transpeptidase (γ GT), fasting glycemia, insulin, and HbA1C, and to negatively correlate with body fat (%) and HDL (Figure 2F).

Discussion

The present clinical study measured scWAT stiffness by shear-wave velocity using a prototype VCTE. Our results showed, for the first time, an association between scWAT IHC-fibrosis and physical measures of tissue stiffness and that this measure was associated with diabetes and metabolic variables. These findings demonstrated that WAT IHC-fibrosis shares common features with liver fibrosis in morbid obesity. However, because of the correlative nature of the relationship between liver and WAT IHC-fibrosis, we cannot speculate on the potential causal and kinetic relationships between these two phenomena. The observed negative association between body fat mass and VCTE, as well as the immunohistochemical quantification of collagens, suggests that diminished WAT stiffness (ie, with reduced collagen accumulation) enables fat mass enlargement, which may at least transiently protect the liver from severe injury. In contrast, increased WAT stiffness may represent a mechanical limitation to WAT expansion. This concept, related to the “adipose-tissue expandability hypothesis” (32), proposes that when the storage capacity of scWAT is reached, a flux of excess lipids is sent to ectopic sites, such as the liver, thus promoting metabolic complications. This concept is supported by the finding of morbidly obese subjects with healthy liver, no diabetes (ie, considered as “metabolically healthy”), in-

creased total fat mass, and decreased scWAT IHC-fibrosis, as well as by the identification of increased WAT stiffness in diabetic obese subjects. However, it cannot be excluded that the diabetic milieu (ie, high glucose and high insulin) could also promote the maintenance and worsening of tissue alteration.

It is intriguing that the physical measures of WAT stiffness were associated with metabolic variables (glucose, insulin, and lipid values), whereas the immunohistochemical quantification of collagens (IHC-fibrosis) was not. We found that collagen amount explained 25.4% of VCTE signal variation, suggesting that factors other than collagen accumulation contribute to the modified stiffness of scWAT. Focused analysis of adipose deposits shows the presence of collagen types I, III, and VI (11). The fibrillar collagens I and III play a role in liver fibrogenesis (11, 33); they bind together, and subsequent tissue stiffness depends on the number of these links (34). A future goal will be to identify which specific collagen types predominantly associate with shear-wave velocity in WAT and whether collagen cross-linking contributes to tissue stiffness. Tissue stiffness may also be determined by other components, such as elastin, laminin, and fibronectin, as well as cellular components of adipose tissue (such as inflammatory cells) that are modified in obesity.

Our results also confirmed, in a larger group, our previous observations that collagen accumulation in WAT seems to be associated with low response to gastric bypass-induced weight loss, even when combined with predictive variables such as age, diabetes, and IL-6. Gradually increased liver fibrosis was also found to be a factor that could associate with low responsive weight loss. Although the reason for this association is unknown, it suggests a relationship between fibrosis-associated functional alterations of tissue function and a response to weight loss, which needs to be explored further. Further studies are needed to investigate the ability of new noninvasive physical methods to predict clinical outcomes following weight loss after bariatric surgery, as well as after dietary interventions.

It also remains unknown why fibrosis develops in human WAT. It has been suggested that persistent inflammatory stimulus causes excessive synthesis of extracellular matrix components and subsequent deposition of interstitial fibrotic materials (11). This phenomenon may particularly occur in the event of rapid and significant weight loss, and it is unknown whether it is reversible with time. An elegant study in mice demonstrated that weight cycling induced increased accumulation of proinflammatory T-cell populations, which could contribute to the negative metabolic consequences of repeated weight variations (35). Altogether, these data suggest that aggravation of adipose tissue inflammation and remodeling during

weight cycling may play a role in causing the metabolic abnormalities occurring in obesity.

In conclusion, the results of this clinical study suggest that human obesity, characterized by gradual enlargement of WAT deposits, causes a fibrotic condition that affects tissue remodeling, functioning, and stiffness. This condition has been described in the liver, as well as in lung, kidney, and heart diseases, for which obesity can be a risk factor (36, 37). Herein, we propose a noninvasive method based on Fibroscan technology to evaluate scWAT IHC-fibrosis, and to thus assess the phenotype of tissue stiffness and evaluate its clinical relevance in obesity and diabetes and during interventional follow-up.

Acknowledgments

We thank the University Pierre et Marie-Curie-Paris 6 (Emergence program), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, and the Direction of Clinical Research (CRC) for their support of this clinical investigation (PHRC 02076 and CRC FIBROTA), as well as the Fondation pour la Recherche Médicale and the National Agency of Research (ANR Adipofib, and the national program “Investissements d’avenir” with the reference ANR-10-IAHU-05). We thank Patricia Bonjour and Nathalie Colnot for assistance with the histological studies. We thank Florence Marchelli for the construction and maintenance of the database.

Address all correspondence and requests for reprints to: Joan Tordjman and Karine Clement, Centre de Recherche des Cordeliers, UMR S 872, Team 7, 15 rue de l’école de médecine, 75006 Paris, Franc. E-mail: joan.tordjman@crc.jussieu.fr and karine.clement@psl.aphp.fr.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Tsuneto A, Hida A, Sera N, et al. Fatty liver incidence and predictive variables. *Hypertens Res*. 2010;33:638–643.
2. Boza C, Riquelme A, Ibañez L, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass. *Obes Surg*. 2005;15:1148–1153.
3. Haentjens P, Massaad D, Reynaert H, et al. Identifying non-alcoholic fatty liver disease among asymptomatic overweight and obese individuals by clinical and biochemical characteristics. *Acta Clin Belg*. 2009;64:483–493.
4. Nigam P, Bhatt SP, Misra A, Vaidya M, Dasgupta J, Chadha DS. Non-alcoholic fatty liver disease is closely associated with sub-clinical inflammation: a case-control study on Asian Indians in North India. *PLoS One*. 2013;8:e49286.
5. Coulon S, Francque S, Colle I, et al. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*. 2012;59:442–449.
6. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Ann Hepatol*. 2007;6:161–163.
7. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40:1387–1395.
8. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51:454–462.
9. Canello R, Tordjman J, Poitou C, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55:1554–1561.
10. Henegar C, Tordjman J, Achard V, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol*. 2008;9:R14.
11. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 2010;59:2817–2825.
12. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56:2910–2918.
13. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*. 2013;18:470–477.
14. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E1016–E1027.
15. Tsigos C, Hainer V, Basdevant A, et al. Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *Obes Facts*. 2008;1:106–116.
16. Canello R, Henegar C, Viguerie N, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54:2277–2286.
17. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology*. 2009;137:532–540.
18. Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial—a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med*. 2013;273:219–234.
19. Fried M, Ribaric G, Buchwald JN, Svacina S, Dolezalova K, Scopinaro N. Metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes in patients with BMI <35 kg/m²: an integrative review of early studies. *Obes Surg*. 2010;20:776–790.
20. Witkamp RF. Current and future drug targets in weight management. *Pharm Res*. 2011;28:1792–1818.
21. Lampe JW, Navarro SL, Hullar MA, Shojaie A. Inter-individual differences in response to dietary intervention: integrating omics platforms towards personalised dietary recommendations. *Proc Nutr Soc*. 2013;72:207–218.
22. Christou NV, Look D, Maclean LD. Weight gain after short- and long-limb gastric bypass in patients followed for longer than 10 years. *Ann Surg*. 2006;244:734–740.
23. Lanyon RI, Maxwell BM. Predictors of outcome after gastric bypass surgery. *Obes Surg*. 2007;17:321–328.
24. Lee YC, Liew PL, Lee WJ, et al. Prediction of successful weight reduction after laparoscopic adjustable gastric banding. *Hepatogastroenterology*. 2009;56:1222–1226.
25. Poitou C, Coupaye M, Laaban JP, et al. Serum amyloid A and obstructive sleep apnea syndrome before and after surgically-induced weight loss in morbidly obese subjects. *Obes Surg*. 2006;16:1475–1481.
26. Tordjman J, Poitou C, Hugol D, et al. Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol*. 2009;51:354–362.
27. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313–1321.
28. Perlemuter G, Naveau S, Belle-Croix F, et al. Independent and op-

- posite associations of trunk fat and leg fat with liver enzyme levels. *Liver Int.* 2008;28:1381–1388.
29. **Ciangura C, Bouillot JL, Lloret-Linares C, et al.** Dynamics of change in total and regional body composition after gastric bypass in obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:760–765.
30. **Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, et al.** Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.* 2003;29:1705–1713.
31. **Genolini C, Falissard B.** KML: k-means for longitudinal data. *Comp Stat.* 2010;25:317–332.
32. **Virtue S, Vidal-Puig A.** Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:338–349.
33. **Odena G, Bataller R.** Liver fibrogenesis: physiopathology [in Spanish]. *Gastroenterol Hepatol.* 2012;35(suppl 2):3–9.
34. **Ricard-Blum S.** The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:a004978.
35. **Anderson EK, Gutierrez DA, Kennedy A, Hasty AH.** Weight cycling increases T-cell accumulation in adipose tissue and impairs systemic glucose tolerance. *Diabetes.* 2013;62:3180–3188.
36. **Haque AK, Gadre S, Taylor J, Haque SA, Freeman D, Duarte A.** Pulmonary and cardiovascular complications of obesity: an autopsy study of 76 obese subjects. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:1397–1404.
37. **Gluba A, Mikhailidis DP, Lip GY, Hannam S, Rysz J, Banach M.** Metabolic syndrome and renal disease. *Int J Cardiol.* 2013;164:141–150.



EndoGrants Central™ features **funding opportunities of interest** to the endocrine community, saving you time and effort.

www.endocrine.org/grants



Résultats étude n°2 : Remodelage de la membrane basale dans le TAB au cours de l'obésité : relation avec l'insulinorésistance.

Ces résultats font suite à deux précédentes études de l'équipe. En effet, le laboratoire a mis en évidence un remaniement excessif de la MEC du TAB au cours de l'obésité (Henegar et al., 2008). Cette altération pathologique du TAB nommée fibrose contribue au développement des comorbidités associées à l'obésité. A la suite de ce constat, l'objectif du laboratoire a été de déterminer précisément la distribution de ces dépôts fibrotiques dans le TAB, leurs compositions et leurs conséquences physiopathologiques chez les sujets obèses.

Dans un article publié en 2010 (Divoux et al., 2010), le laboratoire révélait la présence de dépôts fibrotiques entourant et isolant certains adipocytes du reste du parenchyme dans le TAB de sujets obèses. Or dans cette même étude, les sujets obèses présentant le taux de fibrose péri-cellulaire le plus élevé perdaient le moins de poids suite à la chirurgie bariatrique. Cette étude soulevait alors le rôle que pouvait avoir la fibrose péri-cellulaire sur les complications métaboliques.

Afin d'aller plus loin dans la relation entre fibrose péri-cellulaire et comorbidités associées à l'obésité, l'étude n°1 précédemment décrite dans ce manuscrit a mis en évidence, grâce à une nouvelle technique non-invasive d'estimation de la fibrose du TAB, une relation entre la rigidité du TAB et la dérégulation de l'homéostasie glucidique.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier la Membrane Basale du TAB et l'incidence de l'obésité sur cette MEC spécialisée, de mettre en évidence les acteurs moléculaires associés à la perturbation de cette structure, puis d'en évaluer les conséquences.

1. Caractérisation de la fibrose péri-cellulaire

Dans une première partie, afin d'analyser la fibrose péri-cellulaire, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle ces dépôts fibrotiques entourant les adipocytes provenaient du remodelage pathologique de la MB. Néanmoins, peu d'études s'étaient attachées à décrire cette structure dans le TAB. C'est pourquoi par des techniques d'immunofluorescence et de microscopie électronique à transmission

(MET) ciblant le collagène IV, un des composés majeur de la MB, nous avons analysé sa distribution dans ce tissu. Par ces mêmes techniques de microscopie, nous avons observé que cette structure extracellulaire était plus dense dans le tissu de sujet obèse suggérant une désorganisation de la MB au cours de l'obésité. Les résultats d'expression génique de différents composés de la MB (*COL4A1*, *LAMC1*, *NID-1* et *HSPG2*) corroborent l'analyse morphologique en mettant en évidence une augmentation de l'expression de ces différentes protéines extracellulaires dans les adipocytes isolés de sujets obèses. Les résultats de cette première partie de l'étude identifient la MB du TAB présente autour des adipocytes et des cellules endothéliales comme une structure architecturale pouvant être impliquée dans le remodelage de la MEC du TAB au cours de l'obésité.

2. Relation entre le remodelage de la MB et les complications métaboliques

La deuxième partie de cette étude s'est attachée à établir la relation entre l'altération de la MB du TAB et les complications métaboliques associées à l'obésité. Ainsi dans une première population de sujets obèses morbides non-diabétiques candidats à la chirurgie bariatrique, nous démontrons que l'expression du collagène IV dans le TAsc diminue significativement 6 mois après l'intervention. De façon intéressante, les sujets améliorant le mieux leur index d'insulino-résistance (mesuré d'après l'index HOMA-IR) sont ceux dont l'expression du collagène IV dans le TAB diminue le plus après perte de poids. Afin d'aller plus loin dans l'étude de la relation entre la désorganisation de la MB du TAB et le défaut de sensibilité à l'insuline, nous avons analysé l'expression génique du collagène IV dans le TAsc d'une population de sujets diabétiques non-traités modérément obèses. Dans cette population, nous trouvons ainsi une relation positive entre l'expression génique du collagène IV et l'insulinémie, l'index HOMA-IR et la fonction pancréatique (HOMA-%B) dans cette population. L'index d'insulino-sensibilité (HOMA-%S) est négativement corrélé à l'expression du collagène IV dans le TAB. Ces données témoignent d'une relation entre l'homéostasie glucidique et l'intégrité de la MB du TAsc.

3. Causes du remodelage de la MB

Dans la dernière partie de notre étude, nous avons mis en évidence dans les deux groupes de sujets obèses précédemment décrits une corrélation positive entre l'expression du collagène IV et le TGF β 1 dans le TAB. Le rôle du TGF β 1 ayant été déjà décrit dans le remodelage pathologique de la MB glomérulaire et rétinienne, nous proposons que ce facteur de croissance participe également à l'altération de cette structure dans le TAB au cours de l'obésité. Trois isoformes génétiquement distincts ont été identifiées dans la famille des TGF β (TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3). Des analyses transcriptomiques du laboratoire ont montré que TGF β 1 et TGF β 3 étaient exprimés dans le TAB et variaient au cours de l'obésité, contrairement à l'isoforme TGF β 2 qui n'est pas présente dans ce tissu. Comme pour le TGF β 1, l'expression de TGF β 3 est positivement corrélée à l'expression du collagène IV dans le TAB, et cela dans les deux groupes de sujets obèses.

Afin de vérifier l'impact de ces deux isoformes sur le remodelage de la MB adipocytaire et vasculaire, par des expériences *in vitro*, nous avons étudié l'effet du traitement par le TGF β 1 ou le TGF β 3 sur l'expression du collagène IV dans l'adipocyte et la cellule endothéliale. Ces données posent la question d'une action distincte de ces deux facteurs de croissance en fonction du type cellulaire mis en présence. Ainsi, le traitement par le TGF β 1 ou le TGF β 3 induit un état fibro-inflammatoire dans la cellule endothéliale caractérisé entre autres par une augmentation de l'expression du collagène IV. En revanche, dans le cas de l'adipocyte même si ce type cellulaire présente un état inflammatoire, l'expression des gènes fibrotiques n'est pas modifiée. Ces résultats confirment un effet du TGF β 1 sur l'altération de la MB vasculaire du TAB et mettent en avant pour la première fois le rôle d'une autre isoforme du TGF β , le TGF β 3, dans la mise en place de l'état fibro-inflammatoire des cellules endothéliales au cours de l'obésité. Néanmoins, au niveau adipocytaire, aucune de ces deux isoformes ne semble être impliquée dans la modulation de l'expression du collagène IV. Par conséquent, nous proposons que la désorganisation de la MB adipocytaire précédemment décrite résulte d'un autre processus moléculaire encore non élucidé. Afin d'éclaircir ce point, en parallèle, d'autres acteurs moléculaires connus pour leur rôle comme inducteur de l'expression du collagène IV dans d'autres types cellulaires ont été testés sur les adipocytes.

En considérant que le promoteur du gène *COL4A1* contient un élément de réponse à la protéine Smad1, un médiateur intracellulaire de la superfamille des TGF β , nous avons également évalué l'effet de l'activine A, un autre membre de cette famille de facteur de croissance, sur des adipocytes en culture. Néanmoins, l'activine A n'a aucun effet sur l'induction de l'expression du collagène IV dans ce type cellulaire.

De par la relation étroite existant entre un environnement insulino-résistant et l'expression du collagène IV dans le TAB, nous avons également testé l'effet de produits dérivés due à l'altération du métabolisme glucidique. Les AGE (pour Advanced Glycation End products) font partie de ces substances résultant de l'addition d'un glucide à une protéine sans réaction enzymatique. Or dans de nombreux tissus tel que le rein ou la rétine, ces produits de glycation sont des acteurs majeurs dans leur remodelage de la MB induisant une sur-expression importante de collagène IV. Or, *in vivo*, après avoir incubé les adipocytes en culture avec des AGEs, aucune induction de l'expression de *COL4A1* dans ce type cellulaire également n'a été relevée. Néanmoins, l'altération du métabolisme glucidique est un processus complexe impliquant différentes voies participant à la pathogénèse des tissus. Ainsi, les voies des polyols, des hexosamines ou des PKC pourraient être également examinées précisément quant à leur incidence sur la MB adipocytaire.

En conclusion, l'ensemble de notre étude portant sur la caractérisation détaillée de la fibrose péri-cellulaire, nous a permis de décrire de façon précise la répartition de la MB dans le TAB en fonction du type de dépôts. Au cours de l'obésité, cette MEC spécialisée subit un remodelage suggérant une participation de cette structure à la fibrose péricellulaire. De plus, la désorganisation de la MB survenant dans ce contexte pathologique est associée à une dérégulation de l'homéostasie glucidique. Enfin, le TGF β 1 et le TGF β 3 participent à l'augmentation de l'expression du collagène IV dans les cellules endothéliales et pourraient par conséquent être impliqués dans les dépôts fibrotiques périvasculaires. En revanche, ces deux facteurs de croissance n'ont a priori aucun impact sur la MB adipocytaire.

**Increased basement membrane components in adipose tissue during obesity: links
between collagen IV, TGF β and metabolic phenotypes**

Sophie Reggio^{1,2,3*}, Christine Rouault^{1,2,3*}, Christine Poitou^{1,2,3}, Jean-Christophe Bichet⁴,
Edi Prifti¹, Jean-luc Bouillot⁵, Salwa Rizkalla¹, Danièle Lacasa^{2,3*}, Joan Tordjman^{1,2,3*} and
Karine Clément^{1,2,3*},

- 1 Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière hospital, F-75013, Paris, France;
- 2 INSERM, UMR_S U1166, Nutriomics team, F-75013, Paris, France;
- 3 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1166, F-75005, Paris, France;
- 4 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Plastic surgery and Mammary Cancer department Pitié-Salpêtrière hospital, F-75013 Paris, France
- 5 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Visceral surgery department, Ambroise Paré Hospital, F- 92104, Boulogne, France

Keywords: adipocytes, endothelial cells, basement membrane, TGF β , glucose homeostasis and obesity

Running title: **adipose tissue basement membrane and human obesity**

* shared co-authorship

Corresponding author: Joan Tordjman

e-mail address: joan.tordjman@crc.jussieu.fr

Phone: 00 33 01 40 77 96 70 Fax: 00 33 01 40 77 97 04

Abstract

Context: Collagen accumulation around adipocytes and vessels (i.e. pericellular fibrosis) is a hallmark of obese adipose tissue associated with altered metabolism.

Objective: To evaluate components of basement membrane (BM) in adipose tissue, including collagen IV, a major BM component, and its relationships with metabolic parameters and TGF β isoforms.

Design and setting: We used immuno-techniques and gene expression approaches to detect BM components in subcutaneous and visceral adipose tissue samples. Adipocytes and endothelial cells were isolated from lean and obese adipose tissue. We also focused on the expression of *COL4A1* correlated to metabolic variables in moderate obesity and, in severe obesity before and after bariatric surgery. Using *in vitro* analysis, we explored the impact of TGF β isoforms on the expression of inflammatory and extracellular matrix genes in adipocytes and endothelial cells.

Results: BM components were detected around adipocytes and endothelial cells, and were increased in obese adipocytes. *COL4A1* expression was positively correlated with insulin-resistance indices in obese subjects, and showed less reduction in severely obese subjects with poorer insulin-resistance outcomes six months after gastric bypass. *COL4A1* expression also correlated with *TGF β 1* and *TGF β 3* gene expressions in subcutaneous adipose tissue. Stimulating isolated adipocytes and endothelial cells *in vitro* with these TGF β isoforms showed an inflammatory and pro-fibrotic phenotype. However, TGF β 1 and TGF β 3 exposure only provoked *COL4A1* over-expression in endothelial cells, and not in adipocytes.

Conclusion: The disorganization of several BM components, including collagen IV, contributes to pathological alterations of obese adipose tissue and cells.

Introduction

Obesity and comorbidities are associated with major alterations of white Adipose Tissue (AT) (1). These alterations include increased interstitial fibrosis defined as an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) components (2). Over the last few years, relationships between fibrotic accumulations in AT and obesity-related metabolic deterioration, such as insulin-resistance and type 2 diabetes, have been described (3). At the level of AT, cell types such as adipocytes, progenitors, endothelial, and immune cells, are all embedded in a three-dimensional fibrillar network of ECM proteins (4,5). In human AT, we have observed increased expression (6) and deposition of ECM proteins, that surround not only adipocytes (i.e. called pericellular fibrosis) but also blood vessels (7). Several studies have also explored specific fibrillar collagens and collagen VI, whose expression in AT is associated with metabolic alterations in humans and rodents, and is regulated by weight loss (5,8).

A key component of the ECM is the basement membrane (BM), which is found in close proximity to other cell membranes. The BM of endothelial cells (EC) has been well described in many tissues (10), however in AT, these structures have only been demonstrated via morphological studies focusing on adipocytes (11). The BM provides cellular architectural support and also interacts with integrins for signaling (12). This interaction is crucial for correct cell behavior through outside-in signaling. BMs composition and supramolecular organization depend both on tissue type and specific developmental periods or pathophysiological events within those tissues. These modifications are well described, during glomerulogenesis for example, or diabetic nephropathy and retinopathy (13,14). Collagen IV and laminins are two major components, which self-assemble in the extracellular space to form a network which creates BM ultrastructure. Nidogen and perlecan (HSPG2) bridge the laminin and collagen IV network to stabilize and maintain BM integrity (10). The matricellular protein SPARC, expressed in AT (9), also contributes to BM stabilization.

Collagen IV, a heterotrimeric glycoprotein, accounts for 50% of the BM and is composed of up to six distinct alpha-chains, $\alpha 1(\text{IV})$ to $\alpha 6(\text{IV})$ (15). The chains interact and assemble with remarkable specificity due to specific recognition of non-collagenous domains (7S and NC1) to form three distinct heterotrimers: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ and $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (16). *COL4A1* and *COL4A2* are the most common isoforms and are present in all tissues. Laminins consist of assembled α , β and γ chains, and five α , three β and three types of γ chains have been identified in vertebrates (10). Depending on the chain combination, at least 15 laminin isoforms have been described (10). Laminin knockout mouse models have highlighted the importance of certain chains in a functional ECM structure (19). For example, $\gamma 1$ null mice are embryonically lethal, producing disorganized extracellular deposits of collagen IV and perlecan (20), showing that this ubiquitous subunit is key for correct BM assembly. Thus structural anomalies of BM can lead to tissue dysfunction and eventual lethality in some models (21). Among these anomalies, BM thickening is commonly associated with tissue dysfunction, as shown in diabetic nephropathy or retinopathy (13,14). Collagen IV overexpression and oversecretion in the extracellular space is a hallmark of BM thickening (22), and the pro-fibrotic factor, TGF β 1, is an important molecular contributor (23,24).

Today, morphological analysis has highlighted the presence of BM around adipocytes in AT (11), but no study has specifically explored BM components in lean and obese AT cells, nor the potential relationships between the major BM component collagen IV and metabolic alterations in obesity. Moreover, whereas previous studies showed that TGF β 1 is expressed in AT and is associated with BMI (25), no study has evaluated the potential relationships between TGF β isoforms, collagen IV, and ECM components in obesity.

Thus, using a combination of immuno-technique microscopy and gene expression approaches in human AT samples, we examined BM composition and its variations in adipocytes from both lean and obese subjects. We also assessed the relationships between collagen IV expression and metabolic phenotypes in obese subjects. Finally using 3D *in vitro* models, we

explored the effect of TGF β isoform on the BM, and pro-fibrotic or pro-inflammatory genes in adipocytes and EC from AT.

Materials and Methods

The list of antibodies and chemical compounds used in this study are presented in the Supplemental Data.

Subjects

We obtained SAT samples by needle biopsy from an initial cohort of 60 obese subjects (F/M: 40/20, mean age: 51.29 ± 1.18 and BMI: 31.37 ± 0.44 kg/m²) as described in (26). These subjects were treatment naïve and had impaired fasting glucose. Subjects were without overt diabetes, and had normal renal, hepatic and thyroid function. We obtained serum glucose and insulin after 12-hours of fasting and calculated insulin resistance indexes from HOMA-IR and HOMA-%S measurements, and beta cell function HOMA-%B using the Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance (27).

Secondly, 25 severely obese women candidates for bypass surgery (mean age: 48.9 ± 1.8 and BMI: 47 ± 1.4 kg/m²) were selected. Among them, 16 subjects were non-diabetic and 9 had type 2 diabetes. The subjects had not been dieting before the surgery and their weight had been stable for at least three months prior to surgery. Subcutaneous (SAT) and visceral (VAT) adipose tissue samples were obtained during the surgical procedure. This group of patients was followed-up six months after intervention and SAT samples were also collected. Patients were characterized by a series of bioclinical factors just prior to, and six months following surgery, as previously described (3).

Thirdly, AT biopsies were also obtained from non-obese women (mean age: 46.5 ± 5.1 and BMI: 23 ± 0.5 kg/m²). These subjects had been admitted for scheduled abdominal surgery.

They had no inflammatory state and consented to AT sampling from the same location as obese subjects.

All participants gave written and informed consent. All clinical investigations were performed according to the Declaration of Helsinki and approved by the Pitié-Salpêtrière hospital ethics committees.

Microscopic Analysis of human AT

Immunofluorescence and immunohistochemistry analyses were performed on serial sections of AT from five lean and five obese subjects as described in (28) and (29) respectively. Negative controls were performed by omitting primary antibodies.

Immuno-electron microscopy was performed in human SAT as described in supplementary methods.

Isolation of adipocytes and endothelial cells from human SAT

SAT biopsies were digested with collagenase then adipocytes and EC were isolated as described in (31) and (32) respectively. For each cells types, one part was kept for gene expression analysis and the other for culture experiments.

3D cultures of isolated adipocytes

Adipocytes were cultured in a 3D-cultured model as described in (28). Culture medium was changed every other day.

Gene expression studies

Cultured adipocytes and EC remained untreated or were treated with 5 ng/ml TGF β 1 or TGF β 3 for 48h. mRNA expression was determined by the QuantiGene Plex 2.0 Reagent System (QuantiGene Affymetrix, CA, USA) as described in supplementary methods.

Gene expression was quantified by RT-qPCR in adipocytes or EC isolated from human AT. RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR were conducted as described previously (32). Primers are listed in Supplemental Table 1. Values were normalized to *18S* expression.

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad software (San Diego, CA). Values are expressed as means \pm S.E.M. Differences between variables were determined with non-parametric Mann-Whitney tests (obese *vs* lean subjects) or Wilcoxon tests (SAT *vs* VAT; prior to *vs* six months after surgery). Correlations were examined with non-parametric Spearman correlations. Results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Basement membrane components in human lean adipocytes and endothelial cells

To investigate the BM in AT, we first performed immunofluorescence microscopy to detect collagen IV protein in SAT from non-obese subjects. This initial morphological exploration revealed collagen IV staining surrounding adipocytes and blood vessels (Figure 1A). Immuno-electron microscopy confirmed that collagen IV staining was located proximate to adipocytes (Figure 1C) and EC membranes (data not shown). In isolated adipocytes and EC we assessed the expression of genes encoding several BM components, including *COL4A1*, a ubiquitously expressed α chain and *LAMC1*, the most commonly expressed laminin chain. We also evaluated the gene expression level of other BM components such as *NID-1* and *HSPG2*, as well as *SPARC*, a matricellular protein involved in BM stabilization.

COL4A1 was expressed at similar levels in isolated adipocytes and in EC (Figure 1E). In contrast, *COL4A3* or *COL4A5* transcripts were not detected (data not shown). Expression levels of *LAMC1*, *NID-1*, and *HSPG2*, were similar in lean adipocytes and EC, whereas

SPARC had increased expression in isolated adipocytes compared to EC ($p=0.018$) (Figure 1E). These observations demonstrate that similar to EC, isolated adipocytes express several key BM components, including *COL4A1*.

Basement membrane components increase in obese AT

Via immunofluorescent studies, collagen IV staining was more intense around adipocytes and blood vessels in obese compared to lean SAT samples (Figure 1A-B).

Immuno-electron microscopy analysis confirmed not only the increased amount of collagen IV close to adipocyte membranes, but also different patterns in obese samples. Collagen IV appeared more disorganized with frequent associated clusters around obese compared to lean adipocytes (Figure 1D). We also found an AT depot-dependent pattern of collagen IV. Collagen IV staining was much more intense in SAT from both lean and obese subjects, compared to VAT from both lean and obese subjects (Figure 1G-J).

BM gene expression profiles correlated with histological exploration. *SPARC* gene over-expression was observed in obese adipocytes ($p=0.0208$), which also demonstrated increased *COL4A1* ($p=0.001$), *LAMC1* ($p=0.0033$), *NID-1* ($p=0.0409$) and *HSPG2* ($p=0.05$) expression compared to lean adipocytes (Figure 1F). The expression levels of *COL4A1*, *NID-1* and *SPARC* were also significantly higher in adipocytes isolated from obese SAT compared to VAT (*COL4A1*: $p=0.0048$; *NID-1*: $p=0.0262$; *SPARC*: $p=0.0018$) (Figure 1K). *COL4A1* expression was significantly correlated with *LAMC1*, *NID-1*, and *SPARC* genes in both SAT and VAT (Table S2). Both morphological and gene expression explorations demonstrated increased BM components in obese adipocytes, suggesting they could contribute to BM thickening.

Collagen IV gene expression in obese SAT is associated with glucose metabolism

In diseases such as diabetic nephropathy, increased collagen IV and related BM thickness is induced by hyperglycemia. We thus explored potential links between *COL4A1* expression in SAT (SAT-*COL4A1*) and glucose metabolism from i) moderately obese subjects with increased fasting blood glucose and, ii) severely obese subjects before and after gastric bypass, a condition known to drastically improve glucose metabolism.

In 60 obese subjects with impaired fasting glucose but no anti-diabetic treatment (Table S3), we observed significant correlations between SAT-*COL4A1* expression and markers of glucose homeostasis, such as fasting glucose and insulin, markers of insulin resistance (HOMA-IR and HOMA-%S) and of β -cell function, HOMA-%B, as shown in Table 1. These associations remained after adjusting for weight (data not shown).

We next investigated the relationship between variations in SAT-*COL4A1* expression and glucose metabolism improvement in 16 non-diabetic subjects with severe obesity before and after gastric bypass (Table S4). Six months after bariatric surgery, SAT-*COL4A1* expression decreased by 29.5% ($p < 0.01$) (Fig. 2A). Individual responses to bariatric surgery intervention were highly variable and treatment dependent, consequently we used a clustering approach to stratify the 16 non-diabetic subjects into two equivalent partitions using the median value for each clinical and biological parameter. For each clinical variable, we were then able to identify those that improved the most (top half) and those with little or no improvement (bottom half). Using these partitions, we found that obese subjects with the greatest improvement in HOMA-IR, the insulin-resistance surrogate, were those in which SAT-*COL4A1* decreased the most following surgery ($p=0.0140$) (Figure 2B). No additional relationships were detected between variations in SAT-*COL4A1* following surgery, and other biological or clinical improvement parameters. We also observed that the other previously described BM components were significantly decreased following surgery (Figure S1A-S1C).

Using the same clustering approach for *COL4A1*, we determined that SAT-*NID1* was related to HOMA-IR improvement (data not shown).

Collagen IV gene expression in obese SAT is associated with TGF β isoforms

TGF β 1, a major pro-fibrotic growth factor correlated with BM thickness in several tissues (33). However this specific aspect has never been explored in obese AT. Moreover, using previous microarray data from our laboratory, we have observed that another TGF β isoform, *TGF β 3*, was also highly expressed in human AT while *TGF β 2* was barely detected (data not shown). We then explored the relationship between both *TGF β 1* and *TGF β 3* and BM components in obese SAT.

Similar to *COL4A1*, the expression of both SAT-*TGF β 1* and SAT-*TGF β 3* decreased by 23% and 20% respectively six months after bariatric surgery (Figure 2C and 2D). We found strong positive correlations between SAT-*COL4A1* and SAT-*TGF β 1* expression, as well as between SAT-*COL4A1* and SAT-*TGF β 3*, in the group sampled prior to surgery (Figure 2E and 2F). These associations remained at six months following the weight loss induced by bariatric surgery (data not shown).

We also found positive associations between variations in SAT-*COL4A1* expression and variations in both SAT-*TGF β 1* (Figure 2G) and SAT-*TGF β 3* (Figure 2H) at both baseline and six months post-surgery. Of note, the other previously explored BM components were also positively correlated to SAT-*TGF β 1* or SAT-*TGF β 3* expression (data not shown). To a lesser extent, we also found significant positive associations between the variations in *LAMC1*, *HSPG2*, and *SPARC* expression and those of *TGF β 1* and *TGF β 3* (Figure S1D). These associations suggest potential relationships between pro-fibrotic TGF β isoforms and the modulation of BM components, particularly *COL4A1*.

TGFβ1 and TGFβ3 effects on human adipocytes and endothelial cells

Since SAT-*TGFβ1* and SAT-*TGFβ3* were associated with upregulated SAT-*COL4A1* expression (and other BM components), we hypothesized that these pro-fibrotic factors could induce the synthesis of BM components in AT cells. TGFβ1 is indeed known to induce *COL4A1* over-expression in epithelial cells (34). We used a previously described 3D model to test the effects of these TGFβ isoforms on the genetic expression of two BM components (*COL4A1*, *LAMC1*) and a series of ECM remodeling markers (*COL3A1*, *COL6A3*, *SPARC*, and *LOX*, as well as *CTGF*, *TGFβ1*, *PAI-1*, and *α-SMA*) and inflammation markers (*CCL2*, *IL-6*), in isolated human lean adipocytes and EC.

Firstly, we observed that TGFβ1 treatment induced significant over-expression of *PAI-1*, *TGFβ1*, *CTGF* and *IL6* in both 3D cultured adipocytes (Figure 3A) and EC (Figure 3C). TGFβ1 treatment also increased *SPARC* and *LOX* expression in both types of isolated cells.

In contrast, the genetic expression of BM components (*COL4A1*, *LAMC1*) and other collagens (*COL3A1*) in isolated adipocytes was not significantly changed by TGFβ1 stimulation (Figure 3B). *COL4A1* and *COL6A3* expression were however significantly induced by TGFβ1 in EC (Figure 3D). As observed for TGFβ1, TGFβ3 treatment also provoked a significant up-regulation of *PAI-1*, *TGFβ1*, *α-SMA* and *IL6* in both 3D cultured adipocytes (Figure 4A) and EC (Figure 4C). *CTGF* expression was also strongly induced under these conditions (Figure 4C).

Importantly, TGFβ3 treatment only induced expression of *COL4A1*, *COL6A3*, and *LOX* in EC (Figure 4D).

Discussion

Here we have provided novel insights regarding the expression of BM components in adipocytes and EC, and their modifications in AT during human obesity. We have shown that adipocytes from obese AT samples exhibit augmentations in several BM components.

Amongst them *COL4A1* expression positively associates with markers of glucose homeostasis, and with two TGF β isoforms in obesity. *In vitro* data on human cells indicated that while TGF β 1 and TGF β 3 can stimulate remodeling and the upregulation of pro-fibrotic and inflammatory genes in both adipocytes and EC, they can only induce *COL4A1* expression in EC, and not in isolated human adipocytes.

The BM of EC has been characterized in many tissues, but rarely in human AT, and has never been compared to isolated adipocytes. We observed that EC and adipocytes express common BM components such as a collagen IV protomer (α 1 α 1 α 2), a laminin heterotrimer (containing the γ 1 chain), nidogen and perlecan. While also detected in both of these cell types, transcripts of the matricellular protein SPARC were more highly expressed in adipocytes. This glycoprotein exhibits diverse functions, such as modulating the interaction of cells with the ECM (both the BM and the interstitial matrix) and BM permeability.

By focusing our study on a few major BM components, we can theorize that while adipocytes and EC share some common structural components, organizational differences could be highlighted by variable *SPARC* gene expression, which as others modulates BM architecture to adapt to cell functions.

Obesity induces significant BM component modifications in both EC and adipocytes, as illustrated by increased deposition of collagen IV protein around these cells, and increased BM gene expression in obese compared to lean adipocytes. The increase in BM components was also greater in SAT compared to VAT. Our team recently highlighted the importance of collagen accumulation located not only around adipocytes but also EC (i.e. called pericellular fibrosis) in obese AT (7). Here it is tempting to consider that increases in BM components around these cells, such as collagen IV, contribute to peri-adipocyte and peri-vascular fibrosis. Additional detailed imagery analysis of human AT would be necessary to provide further insights regarding the structural organization of pericellular fibrosis.

In many tissues such as kidney or retina, BM remodeling is related to insulin resistance and a hyperglycemic environment. We have previously shown that pericellular fibrosis in AT is associated with deterioration of metabolic parameters, and also with diabetes in severe obesity (3,8). BM components were not explored in this pathological context, instead focus was made on collagen VI, a type of collagen which forms the interface between BM and thick bundles of collagen I. The expression of collagen VI in AT has been correlated to glucose metabolism impairment in human populations (35). Here, we have shown that the expression of collagen IV, a major component of adipose BM, also associates with several variables related to glucose homeostasis and insulin-resistance in obese individuals with impaired fasting glucose and naïve of treatment. While this quantitative association was not observed at baseline in more severe forms of obesity, *COL4A1* expression in AT significantly decreased six months after bariatric surgery, and was associated with improved metabolic condition. This observation correlates with a previous study from our team demonstrating that the expression of several types of collagen were down-regulated in AT one year after gastric bypass (8). In the current study, subjects with the greatest HOMA-IR improvement had the lowest *COL4A1* expression six months after the surgery. These data are only correlative, but they do help predict the impact of hyperglycemic/hyperinsulinemic tissue environments on BM component synthesis in AT cells.

Deeper insights into molecular interactions are also needed. As such, TGF β isoforms are relevant candidates as in addition to their pro-fibrotic roles, TGF β 1 can induce collagen IV expression and BM thickening in other tissues, such as kidney and retina. This link may also exist in AT. Our association studies indeed showed strong positive correlations between *COL4A1* and TGF β 1 expression in the SAT of severely obese subjects, both prior to, and six months post-surgery. Similar associations were found for the TGF β 3 isoform, also highly expressed in AT. These observations prompted us to examine whether both TGF β isoforms could induce the expression of *COL4A1* and other remodeling genes in human isolated

adipocytes and EC, using a previously described *in vitro* 3D model (28). Both TGF β 1 and TGF β 3 induced the expression of several pro-fibrotic and inflammatory genes in adipocytes and EC, but *COL4A1* expression was only significantly induced in EC.

This raises important questions about whether other pro-fibrotic stimuli can induce adipocyte BM remodeling and change ECM composition in obese AT. In our 3D model, we tested other known collagen IV-inducers, such as activin A and advanced glycation end product (AGE), but neither induced BM component expression in isolated adipocytes (data not shown).

Recently, one study demonstrated that another TGF β superfamily member, BMP4, induces *COL4A1* and *COL4A2* expression in isolated glomeruli from mouse kidneys (36). While a recent study highlighted that BMP4 has an anti-inflammatory effect in adipocytes, its action on collagen IV expression in adipocytes should also be explored (37).

Treating isolated adipocytes and EC with TGF β isoforms induced *LOX* expression, an enzyme that plays a key role in catalyzing covalent collagen crosslinks in the extracellular environment, and regulates ECM mechanical properties. Both adipocytes and EC may thus contribute to AT fibrosis via the thickening of their own BM due to pro-fibrotic stimuli. We have also shown that *LOX* expression is induced in obese AT (31) and is decreased after weight loss (8) suggesting modulation of collagen cross-linking with subsequent effects impacts on cell constraints. Our laboratory indeed demonstrated that adipocytes could also be considered as mechano-sensitive cells subject to bilateral mechanical forces during obesity (31). On one hand, lipid droplet growth exerts physical stress from inside the cell, and on the other, AT fibrosis characterized by fibrillar cross-linked collagen can create constraints from the outside in. Interestingly, collagen IV knockout studies in *C. elegans* and mice have demonstrated that this BM component is crucial in enabling cells to respond to mechanical constraints by transmitting signals between cells and interstitial matrix (38,39). It is thus tempting to suggest that collagen IV accumulation around obese adipocytes could be

governed by mechanical stresses, either induced by lipid droplet enlargement and/or fibrosis accumulation. Further studies are needed to investigate this aspect in more depth.

In conclusion we have described major BM component modification in adipocytes and EC during obesity. Collagen IV is a major BM component associated with *in vivo* metabolic alterations in human obesity, thus future molecular studies are needed to determine both its regulation and contribution to altered adipocyte biology.

Acknowledgments

The clinical work was supported by clinical research contracts (PHRC 0702 to KC and CRC NCT00476658 to CP). Funding was obtained from the *Fondation pour la Recherche Médicale* (FRM DEQ20120323701) and the National Agency of Research (ANR, Adipofib). Electron microscopy experiments were performed using the electron microscopy service at IBPS/FR3631-P and M. Curie University, Paris, France. We thank patients and nurses, as well as Clinical Research Assistant Valentine Lemoine and Dr Marcheli for patient recruitment and data management aspects. We thank Rachel Peat for editing and English correction.

References

1. **Sam S, Mazzone T.** Adipose tissue changes in obesity and the impact on metabolic function. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 2014;164(4):284–292.
2. **Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE.** Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 2013;18(4):470–477.
3. **Abdenmour M, Reggio S, Le Naour G, Liu Y, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Charlotte F, Bouillot J-L, Torcivia A, Sasso M, Miette V, Zucker J-D, Bedossa P, Tordjman J, Clément K.** Association of Adipose Tissue and Liver Fibrosis with Tissue Stiffness in Morbid Obesity: Links with Diabetes and BMI Loss after Gastric Bypass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;jc20133253.
4. **Divoux A.** Architecture and the extracellular matrix: the stil... [Obes Rev. 2011] - PubMed - NCBI. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/21366833>. Accessed September 6, 2011.
5. **Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE.** Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(6):1575–1591.
6. **Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker J-D, Clement K.** Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* 2008;9(1):R14.
7. **Divoux A.** Fibrosis in Human Adipose Tissue: Composition, Distribution, and Link With Lipid Metabolism and Fat Mass Loss. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/gate2.inist.fr/content/59/11/2817.full.pdf+html>. Accessed September 6, 2011.
8. **Liu Y, Aron-Wisnewsky J, Marcelin G, Genser L, Le Naour G, Torcivia A, Bauvois B, Bouchet S, Pelloux V, Sasso M, Miette V, Tordjman J, Clément K.** Accumulation and Changes in Composition of Collagens in Subcutaneous Adipose Tissue Following Bariatric Surgery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;jc20153348.
9. **Kos K, Wong S, Tan B, Gummesson A, Jernas M, Franck N, Kerrigan D, Nystrom FH, Carlsson LMS, Randeva HS, Pinkney JH, Wilding JPH.** Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose. *Diabetes* 2009;58(8):1780–1788.
10. **LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R.** Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* 2007;232(9):1121–1129.
11. **Pierleoni C, Verdenelli F, Castellucci M, Cinti S.** Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. *Eur. J. Histochem. EJH* 1998;42(3):183–188.
12. **Yurchenco PD.** Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011;3(2). doi:10.1101/cshperspect.a004911.
13. **Mora-Fernández C, Domínguez-Pimentel V, de Fuentes MM, Górriz JL, Martínez-Castelao A, Navarro-González JF.** Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. *J. Physiol.* 2014;592(Pt 18):3997–4012.

14. **Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E.** Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr. Eye Res.* 2010;35(12):1045–1056.
15. **Zhou J, Ding M, Zhao Z, Reeders ST.** Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *J. Biol. Chem.* 1994;269(18):13193–13199.
16. **Borza DB, Bondar O, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Todd P, Hudson BG.** The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. *J. Biol. Chem.* 2001;276(30):28532–28540.
17. **Heikkilä P, Soininen R, Tryggvason K.** Directional regulatory activity of cis-acting elements in the bidirectional alpha 1(IV) and alpha 2(IV) collagen gene promoter. *J. Biol. Chem.* 1993;268(33):24677–24682.
18. **Kalluri R.** Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3(6):422–433.
19. **Ryan MC, Christiano AM, Engvall E, Wewer UM, Miner JH, Sanes JR, Burgeson RE.** The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 1996;15(6):369–381.
20. **Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D.** Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J. Cell Biol.* 1999;144(1):151–160.
21. **Tsilibary EC.** Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J. Pathol.* 2003;200(4):537–546.
22. **Nishikawa T, Giardino I, Edelstein D, Brownlee M.** Changes in diabetic retinal matrix protein mRNA levels in a common transgenic mouse strain. *Curr. Eye Res.* 2000;21(1):581–587.
23. **Garud MS, Kulkarni YA.** Hyperglycemia to nephropathy via transforming growth factor beta. *Curr. Diabetes Rev.* 2014;10(3):182–189.
24. **Gerhardinger C, Dagher Z, Sebastiani P, Park YS, Lorenzi M.** The transforming growth factor-beta pathway is a common target of drugs that prevent experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 2009;58(7):1659–1667.
25. **Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, Geel O, Juhan-Vague I.** Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 2000;49(8):1374–1380.
26. **Rizkalla SW, Prifti E, Cotillard A, Pelloux V, Rouault C, Allouche R, Laromiguière M, Kong L, Darakhshan F, Massiera F, Clement K.** Differential effects of macronutrient content in 2 energy-restricted diets on cardiovascular risk factors and adipose tissue cell size in moderately obese individuals: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012;95(1):49–63.
27. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412–419.

28. **Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot J-L, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson P-A, Barsh GS, Zucker J-D, Basdevant A, Langin D, Clément K.** Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005;54(8):2277–2286.
29. **Zelechowska MG, Mandeville R.** Immunogold and immunogold/silver staining in the ultrastructural localization of target molecules identified by monoclonal antibodies. *Anticancer Res.* 1989;9(1):53–57.
30. **Pellegrinelli V, Heuvingh J, du Roure O, Rouault C, Devulder A, Klein C, Lacasa M, Clément E, Lacasa D, Clément K.** Human adipocyte function is impacted by mechanical cues. *J. Pathol.* 2014;233(2):183–195.
31. **Rouault C, Pellegrinelli V, Schilch R, Cotillard A, Poitou C, Tordjman J, Sell H, Clément K, Lacasa D.** Roles of Chemokine Ligand-2 (CXCL2) and Neutrophils in Influencing Endothelial Cell Function and Inflammation of Human Adipose Tissue. *Endocrinology* 2013;154(3):1069–1079.
32. **Pellegrinelli V, Rouault C, Veyrie N, Clément K, Lacasa D.** Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1. *Diabetes* 2014;63(2):535–549.
33. **Hoňková L, Uhlík J, Beránková K, Svobodová T, Pohunek P.** Epithelial basement membrane thickening is related to TGF-Beta 1 expression in children with chronic respiratory diseases. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* 2014;25(6):593–599.
34. **Chai Q, Krag S, Miner JH, Nyengaard JR, Chai S, Wogensen L.** TGF-beta1 induces aberrant laminin chain and collagen type IV isotype expression in the glomerular basement membrane. *Nephron Exp. Nephrol.* 2003;94(4):e123–136.
35. **Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, Ravussin E, Bray GA, Smith SR.** Adipose tissue collagen VI in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94(12):5155–5162.
36. **Matsubara T, Araki M, Abe H, Ueda O, Jishage K, Mima A, Goto C, Tominaga T, Kinoshita M, Kishi S, Nagai K, Iehara N, Fukushima N, Kita T, Arai H, Doi T.** Bone Morphogenetic Protein 4 and Smad1 Mediate Extracellular Matrix Production in the Development of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2015;64(8):2978–2990.
37. **Baraban E, Chavakis T, Hamilton BS, Sales S, Wabitsch M, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M.** Anti-inflammatory properties of bone morphogenetic protein 4 in human adipocytes. *Int. J. Obes.* 2005 2015. doi:10.1038/ijo.2015.141.
38. **Guo XD, Johnson JJ, Kramer JM.** Embryonic lethality caused by mutations in basement membrane collagen of *C. elegans*. *Nature* 1991;349(6311):707–709.
39. **Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U.** Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Dev. Camb. Engl.* 2004;131(7):1619–1628.

Table 1: Correlation between collagen IV gene expression in subcutaneous adipose tissue and clinical parameters during obesity

	<i>COL4A1</i> mRNA relative expression (A.U)
Weight (kg)	-0.13 (p=0.331)
BMI (kg/m ²)	0.40 (p=0.002)
Glycemia (mM)	0.74 (p=0.046)
Insulinemia (μU/mL)	0.50 (p<0.001)
HOMA-IR	0.49 (p=0.002)
HOMA-%S	-0.49 (p<0.001)
HOMA-%B	0.42 (p=0.02)
FFA	0.10 (p=0.475)

Data are expressed as r and p values obtained from Spearman's correlation. In bold, significant correlations. n=60 HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance; HOMA-%S: Insulin sensitivity; HOMA-%B: beta cell function; FFA: Free Fatty Acid

Figure legends

Figure 1: BM components in lean and obese human adipose tissue

(A-D) Collagen IV immunofluorescence in lean (A) and obese human subcutaneous adipose tissue (B) Collagen IV immuno-electron microscopy in lean (C) and obese (D) human subcutaneous adipose tissue. Representative samples are shown from a set of five explored samples. (E) *COL4A1*, *LAMC1*, *NID-1*, *HSPG2* (perlecan), and *SPARC* expression was quantified by real-time PCR and normalized to *18S* in adipocytes (n=12; white bar) and compared to endothelial cells (n=5; grey bar) from lean subcutaneous adipose tissue. (F)-*COL4A1*, *LAMC1*, *NID-1*, *HSPG2* (perlecan), and *SPARC* expression was quantified using real-time PCR and normalized to *18S* in lean (n=12; white bar) or obese (n=12; black bar) adipocytes. (G-J) Collagen IV immunohistochemistry in either lean human subcutaneous, (G) or visceral adipose tissue (I); and in obese human subcutaneous (H) or visceral adipose tissue (J). Representative samples are shown after the histological analysis of 5 subjects for each condition. (K) *COL4A1*, *LAMC1*, *NID-1*, *HSPG2* (perlecan), and *SPARC* expression was quantified by real-time PCR and normalized to *18S* in adipocytes isolated from either obese subcutaneous (n=16; black bars) or visceral adipose tissue (n=16; hatched bars). Ad: adipocytes; EC: endothelial cells; SAT: subcutaneous adipose tissue; VAT: visceral adipose tissue; arrow: collagen IV. Data are expressed as mean \pm SEM. Significant differences between groups are indicated *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ Mann-Whitney's test or Wilcoxon's test for subcutaneous versus visceral adipose tissue comparison.

Figure 2: Decreased expression of collagen IV, TGFβ1, and TGFβ3 in subcutaneous adipose tissue following weight-loss is associated with improved glucose metabolism parameters.

(A). *COL4A1*, (C) *TGFβ1*, and (D) *TGFβ3* expression was quantified by real-time PCR and normalized to *18S* in human obese subcutaneous adipose tissue before (black bars) and after weight loss (hatched bars). T0: Before weight loss; T6: six months after weight loss; SAT: subcutaneous adipose tissue. (B). Average *COL4A1* expression in subcutaneous adipose tissue after patient samples were clustered depending on HOMA-IR improvement six months after surgery. Data are expressed as mean ± SEM. Statistically significant differences between groups are indicated ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. $n = 25$. Correlation analysis between subcutaneous adipose tissue *COL4A1* expression and *TGFβ1* before (E) and six months after surgery (G); and *TGFβ3* before (F) and six months after surgery (H). Wilcoxon's tests were used in (A), (B), (C), and (D), and Pearson's correlations were used in (E), (F), (G), and (H). $n = 25$

Figure 3: TGFβ1 effects on ECM and inflammatory genes in 3D adipocytes and endothelial cells isolated from lean human subcutaneous adipose tissue.

3D adipocytes and endothelial cells were treated for 48h with 5 ng/mL recombinant TGFβ1. (A-B) Inflammatory genes were quantified by Quantiplex Assays in either non-treated (white bars) or treated (black bars) 3D adipocytes (A); and non-treated (light grey bars) or treated (dark grey bars) endothelial cells (B). (C-D) ECM remodeling genes were quantified by Quantiplex Assays in either non-treated (white bars) or treated (black bars) 3D adipocytes (C); and non-treated (light grey bars) or treated (dark grey bars) endothelial cells (D). Ad: adipocyte ($n = 12$); EC: endothelial cells ($n = 8$). Statistically significant differences between groups are indicated *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ Wilcoxon's test.

Figure 4: TGF β 3 effects on ECM and inflammatory genes in 3D adipocytes and endothelial cells isolated from lean human subcutaneous adipose tissue.

3D adipocytes and endothelial cells were treated for 48h with 5 ng/mL recombinant TGF β 3. A-B Inflammatory genes were quantified by Quantiplex Assays in either non-treated (white bars) or treated (black bars) 3D adipocytes (A); and non-treated (light grey bars) or treated (dark grey bars) endothelial cells (B). C-D ECM remodeling genes were quantified by Quantiplex Assays in either non-treated (white bars) or treated (black bars) 3D adipocytes (C); and non-treated (light grey bars) or treated (dark grey bars) endothelial cells (D). Ad: adipocyte (n=9); EC: endothelial cells (n=6). Statistically significant differences between groups are indicated *** p<0.001; ** p<0.01; *p <0.05 Wilcoxon's test.

Figure 1

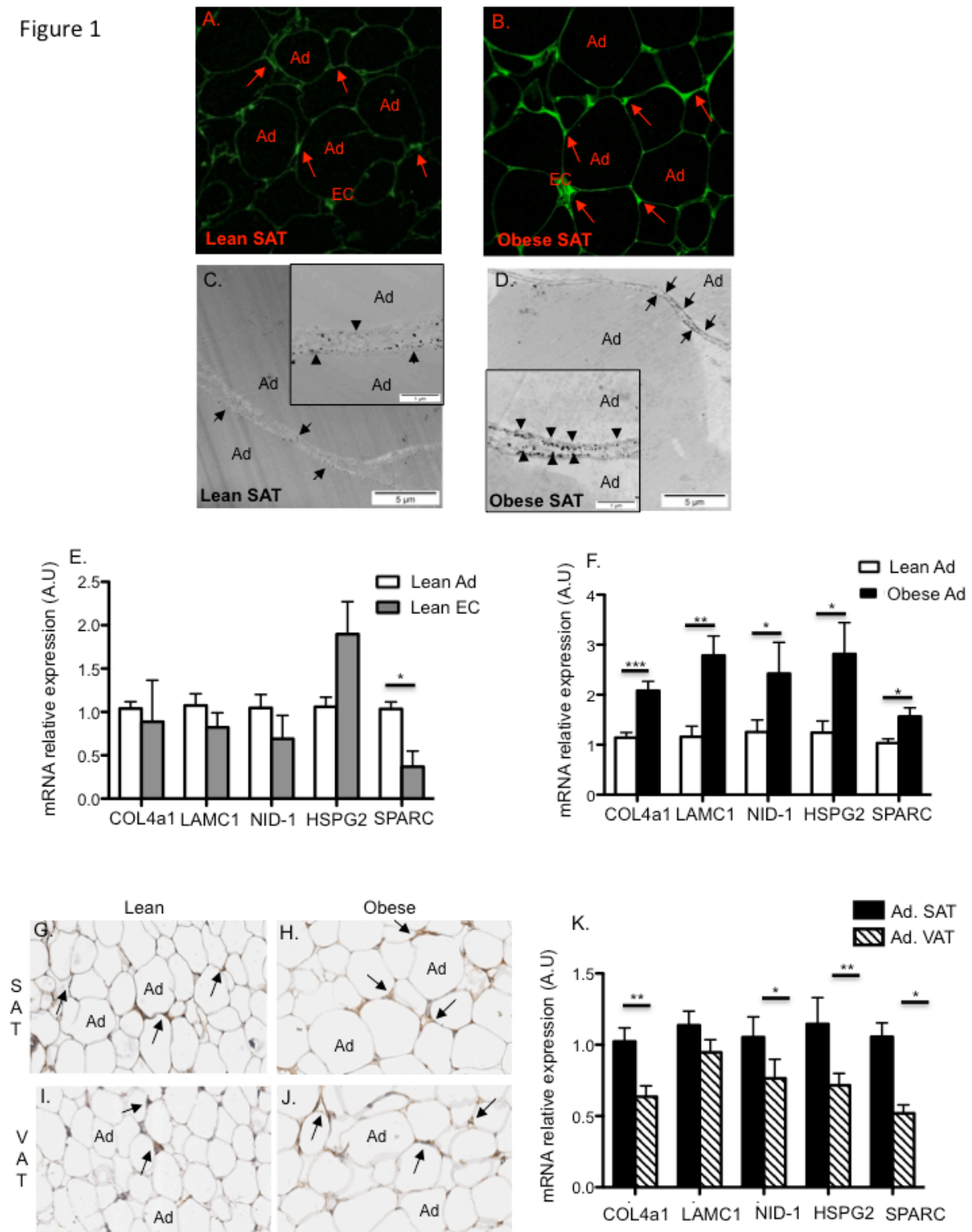


Figure 2

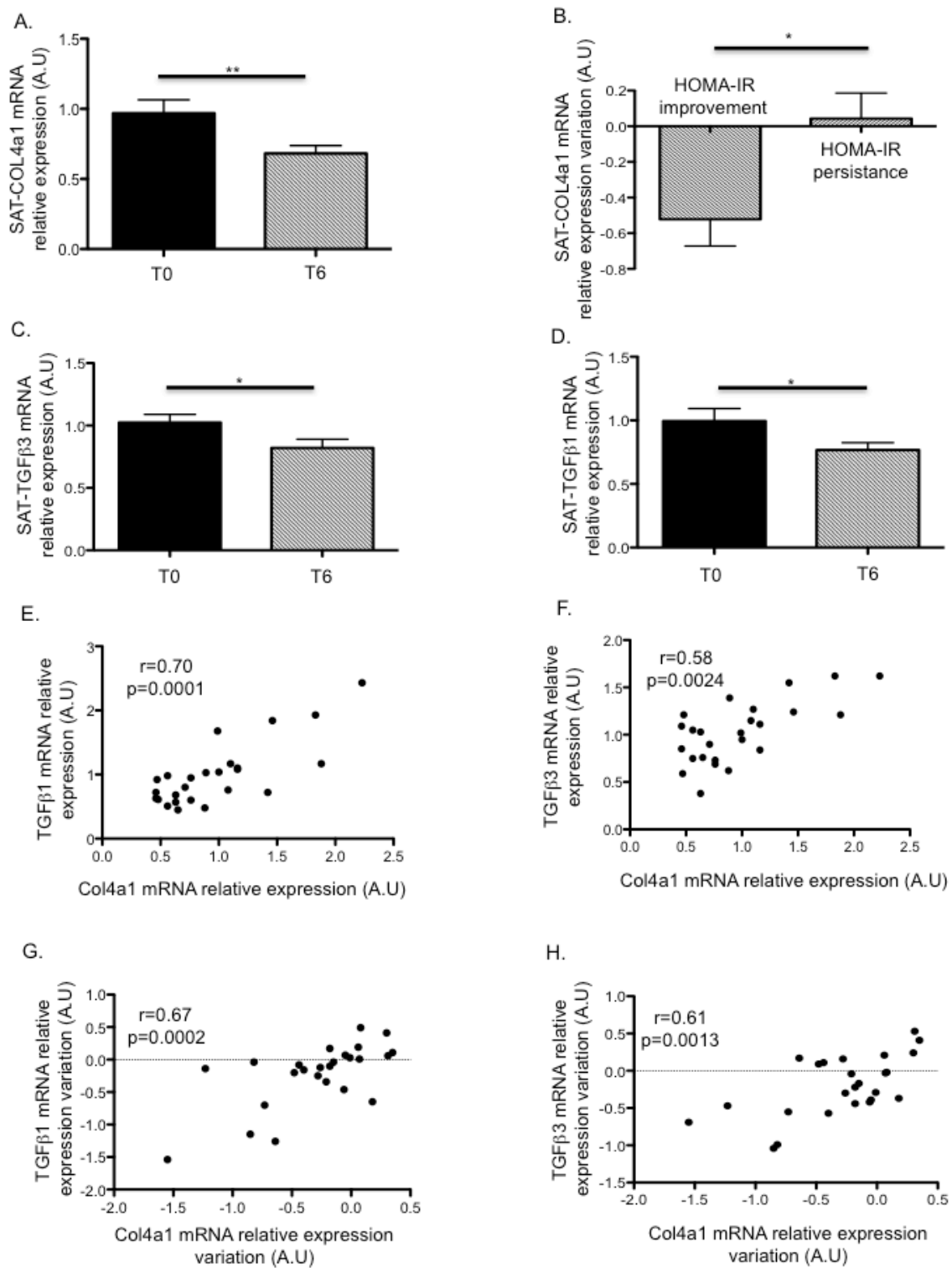


Figure 3

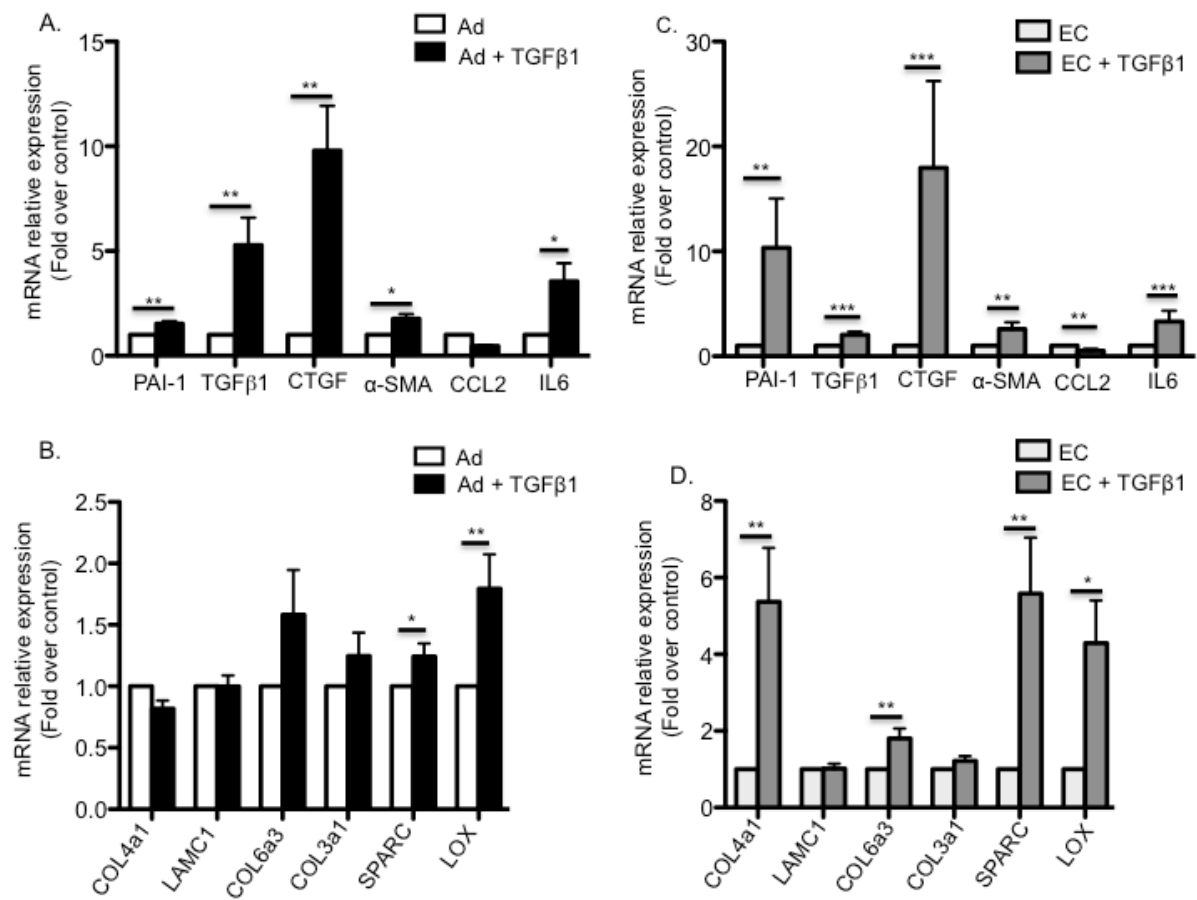
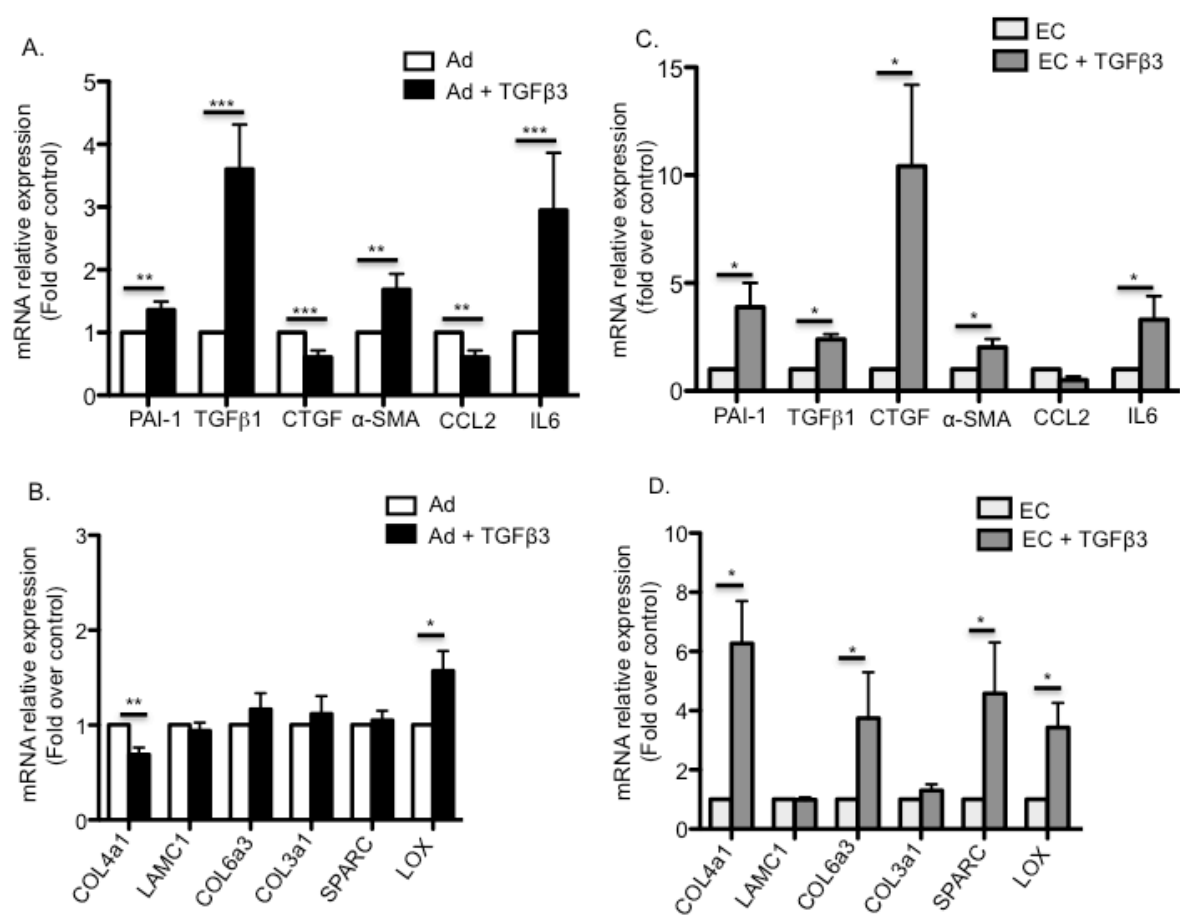


Figure 4



Supplementary Methods:

The following is the list of the materials used in the study: rabbit anti-human collagen IV (Novotec, Lyon, France), fluoro-nanogold anti-rabbit (Nanoprobes, New-York, USA), anti-CD31 (M0823, Dako, Glostrup, Denmark), collagenase A (Roche Applied Science, Pissarzyska, Germany), immunoselection cocktails EasySepTM “Do it yourself” selection kit (Stemcell technologies, Grenoble, France), Puramatrix (Corning, New-York, USA), human recombinant TGF- β 1 and TGF- β 3 (R&D Systems, Minneapolis, USA). ELISA tests of leptin, adiponectin and IL-6 (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Immuno-electron microscopy in human SAT

Collagen IV localization was analyzed using the pre-embedding immunogold method with silver enhancement (30). SAT samples were immersion-fixed in 0.2% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde at room temperature (RT) for 30 min. After agarose inclusion, vibratome sections (80 μ m) were collected in PBS and incubated for 30 min in PBS with 4% goat serum at RT. Sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal collagen IV diluted in PBS with 4% goat serum. Sections were rinsed in PBS (3 x 10 min) and incubated with Fluoro-nanogold anti-rabbit antibody diluted in PBS with 0.2% fish skin gelatin and 2% bovine serum albumin (BSA), for 2 h at RT. After 3 x 10 min PBS washes, sections were post-fixed 10 min in 1% glutaraldehyde. After 3 x 10 min PBS washes and 3 x 10 min washes in 0.1M sodium acetate buffer pH7, silver enhancement (HQ silver, Nanoprobes, NY) was performed in the dark for 3 min and stopped by several rinses in 0.1M sodium acetate buffer pH 7.4. Sections were post-fixed 10 min in osmium tetroxide (1% water) at RT. After rinsing, they were dehydrated in serial ethanol dilutions (50%, 70% with 1% uranyl acetate, 95%, and 100%) followed by 10 min in propylene oxide. Samples were then infiltrated with 3:1 propylene oxide:epon resin for 30 min, then with 1:1 propylene oxide:epon resin for 30 min,

and finally with 1:3 propylene oxide:epon resin overnight at 4 °C. Sections were embedded in epon resin and were mounted on sigmacoated glass slides and polymerized at 60 °C for 48 h. Areas of interest were excised and glued to resin blocks. An ultracut UCT microtome (LEICA Microsystems, IL, USA) was used to generate 70 nm-thick sections, which were collected onto copper rhodium-coated grids. Grids were stained for 2 min in 0.2% lead citrate, and then analyzed with transmission electron microscopy (EM 912 Omega, Zeiss; München, Germany) equipped with a laB6 filament at 80kV. Images were captured with a digital camera (SS-CCD, Veleta 2kx2k) with iTEM software (Olympus, Münster, Germany).

Quantigen Plex Assay

Affymetrix has developed individual bead-based oligonucleotide probe sets specific for each examined gene. Samples were analyzed via the Luminex-200 system (Luminex Corporation, TX, USA), and data were acquired using Xponent software V3. Assays were performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells lysates were incubated overnight at 54 °C with X-MAP beads containing oligonucleotide capture probes, label extenders, and blockers. The next day, beads and bound target RNA were washed and subsequently incubated with preamplifier solution at 50 °C for 1 h, then samples were washed and incubated with amplifier solution at 50 °C for 1 h. Subsequently, samples were washed and incubated with label probe (biotin) at 50 °C for 1 h. Samples were washed again and incubated with streptavidin-conjugated R-phycoerythrin, which binds biotinylated probes, at room temperature for 30 min. Streptavidin-conjugated R-phycoerythrin fluorescence was then detected for each analyte within each sample. All data were standardized to housekeeping genes and normalized to control cells.

Supplementary Table:**Table S1: list of the primers sequences used for real-time PCR**

Gene	Forward	Reverse
<i>COL4A1</i>	cgggtacccaggactcatag	ggacctgttcacccttttc
<i>COL4A3</i>	agcccacggacaagacct	gaatggcattgtgtaaatacg
<i>COL4A5</i>	agagcccacggtaagact	catgaaaggcatggtactaaagc
<i>LAMC1</i>	gtgctgtgttcccaagaca	gccatcatcacagagctcac
<i>NID1</i>	cagttttcagatgaggaacg	tgaaggccagtttcacagtagtt
<i>HSPG2</i> (perlecan)	tctggctcaagtgtgtcc	gaggaggagggtctgatg
<i>SPARC</i>	tttgatgatggtgcagagga	gtggttctggcagggattt
<i>TGFB1</i>	gcagcacgtggagctgta	cagccggttgctgaggtta
<i>TGFB3</i>	aagaagcgggcttggac	cgcacacagcagttctcc

Table S2: Correlation between *COL4A1* and BM component expression in obese adipocytes isolated from human subcutaneous or visceral adipose tissue

	Ad. SAT relative mRNA expression	Ad. VAT relative mRNA expressio
<i>COL4A1</i> vs <i>LAMC1</i>	0.60 (p=0.047)	0.57 (p=0.021)
<i>COL4A1</i> vs <i>NID1</i>	0.66 (p=0.004)	0.76 (p=0.0007)
<i>COL4A1</i> vs <i>SPARC</i>	0.54 (p=0.026)	0.71 (p=0.002)

Abbreviations: Ad: Adipocytes; SAT: subcutaneous adipose tissue; VAT: Visceral adipose tissue; n=16. Data are expressed as r and p (in parenthesis) values obtained using Spearman's correlation. In bold, significant correlations.

Table S3: Clinical parameters of obese subjects with impaired fasting glucose

n (women/men)	40/20
Age (years)	51.3 ± 1.2
BMI (Kg/m ²)	31.4 ± 0.4
Weight (Kg)	86.9 ± 1.6
Glycemia (mmol/L)	6.1 ± 0.1
HOMA-IR	1.3 ± 0.1
Insulinemia (μU/L)	9.3 ± 0.6
Insulin sensitivity (HOMA-%S)	63.2 ± 2
B-cell function (HOMA-%B)	4.5 ± 0.4

Table S4: Clinical parameters of non-diabetic morbidly obese women subjects before (T0) and six months after surgery (T6)

	T0	T6	P Value
n	16	16	-
Age (years)	48.9 ± 1.8	48.9 ± 1.8	-
BMI (Kg/m ²)	46 ± 2.1	34.8 ± 1.7	< 0.0001
Glycemia (mmol/L)	5.6 ± 0.24	5.24 ± 0.24	NS (0.0779)
Insulinemia	15.1 ± 1.97	7.87 ± 0.72	0.0009
HOMA-IR	3.8 ± 0.51	1.85 ± 0.2	0.0006
HbA1c (%)	6.2 ± 0.2	5.8 ± 0.2	0.0013
Leptin (ng/mL)	61.9 ± 8.9	23.3 ± 3.9	0.0012
Adiponectin (µg/mL)	5 ± 0.6	6.6 ± 0.36	0.0126

P values were obtained using Wilcoxon's tests

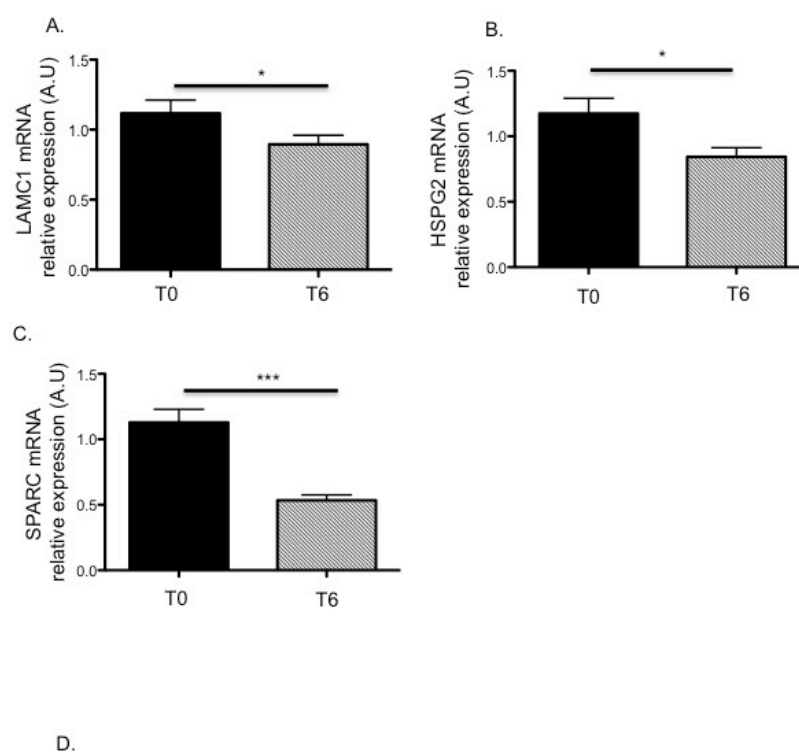
Table S5: Clinical parameters of morbidly obese subjects before (T0) and six months after surgery (T6)

	T0	T6	P Value
n	25	25	-
Age (years)	48.9 ± 1.8	48.9 ± 1.8	-
BMI (kg/m ²)	47 ± 1.4	35.7 ± 1.2	< 0.0001
Type 2-Diabetic (%)	15 (60)	15 (60)	-
Glycemia (mmol/L)	5.9 ± 0.21	5.3 ± 0.2	0.0067
HOMA-IR	4.1 ± 0.49	2.04 ± 0.2	0.0003
HbA1c (%)	6.4 ± 0.16	5.8 ± 0.1	0.0019
Leptin (ng/mL)	62.6 ± 5.6	27.3 ± 3.7	< 0.0001
Adiponectin (µg/mL)	4.5 ± 0.4	6.3 ± 0.36	0.0003

P values were obtained using Wilcoxon's tests.

Additional results

Figure S1: The reduced expression of *LAMC1*, *HSPG2*, and *SPARC* in subcutaneous adipose tissue seen with weight loss, is also associated with variations in *TGFB1* and *TGFB2* expression.



DISCUSSION GENERALE

ET

CONCLUSION

Discussion générale et perspectives

Ce travail de thèse détaille une structure extracellulaire encore peu décrite dans le TAB humain, la Membrane Basale. Elle est présentée comme un « acteur » de la fibrose de ce tissu survenant au cours de l'obésité en association avec une altération de certains paramètres métaboliques.

L'atout majeur de ce projet a été de s'appuyer sur des prélèvements de TAB humains obèses obtenus lors des chirurgies de l'obésité. Ces prélèvements sont effectués dans le cadre de protocole d'investigations cliniques et ont reçu l'accord du Comité d'Ethique. Ils nous ont permis une analyse morphologique fine par des techniques de immuno-microscopie et des études d'expression génique des composés majeurs de la Membrane Basale. Les études cellulaires d'adipocytes matures et de cellules endothéliales ont été réalisées à partir de ces tissus.

I. Description de la Membrane Basale du TAB en condition physiologique et physiopathologique

Au cours de l'obésité, le TAB est soumis à une inflammation chronique caractérisée par une infiltration massive de cellules immunitaires. Or ce phénomène comme dans tous tissus est à l'origine d'un remodelage drastique de sa MEC caractérisé par une accumulation excessive de dépôts fibrotiques dans le TAB obèse. Cet état fibro-inflammatoire est impliqué dans l'altération de certains paramètres métaboliques favorisant par conséquent la mise en place de certaines pathologies. La description et la caractérisation de ces dépôts fibrotiques est nécessaire à une meilleure compréhension des mécanismes engagés dans la fibrogénèse de ce tissu et les relations existantes avec les comorbidités associées à l'obésité. Dans un article récemment publié par le laboratoire (Divoux et al., 2010), l'analyse détaillée de l'organisation et de la distribution des dépôts fibrotiques du TAB a mis en évidence la présence de fibrose péri-adipocytaire et périvasculaire. Cette déformation de la MEC entourant deux types cellulaires importants pour l'activité métabolique du TAB pourrait avoir un impact sur la physiopathologie de l'obésité.

En effet, une autre étude du laboratoire a révélé une association étroite entre la rigidité du TAB et le diabète (Abdenmour et al., 2014). Notre étude suggère que la Membrane Basale de l'adipocyte et de la cellule endothéliale concourt à ces dépôts fibrotiques. Cette hypothèse a alors soulevé la question de l'impact de ce remodelage architectural sur les complications métaboliques associées à l'obésité.

1. La Membrane Basale du TAB : description et caractérisation

La Membrane Basale est un fin feuillet de MEC spécialisée apportant un soutien architectural aux cellules tout en leur adressant des signaux modulant leurs comportements cellulaires face à leur environnement. Seuls certains types cellulaires possèdent cette MEC hautement spécialisée. Ainsi, les adipocytes et les cellules endothéliales sont deux types cellulaires décrits comme étant entourés par une Membrane Basale. La composition macromoléculaire au niveau des cellules endothéliales a été très largement détaillée dans d'autres tissus. Néanmoins, peu d'études ont réellement spécifié les constituants de la MB adipocytaire. Nos observations morphologiques ont révélé la présence de cette structure dans le TAB sans élucider la composition exacte de la MB adipocytaire. Dans un premier temps, nous avons par des techniques d'immunofluorescence et de Microscopie Electronique à Transmission ciblant le collagène IV, l'un des composants majeurs des MB, confirmé la présence de cette structure dans le TAB non-obèse autour des adipocytes et des cellules endothéliales. Afin de caractériser les constituants macromoléculaires de ces deux MB, par une mesure d'expression génique, nous avons déterminé les différents constituants des MB dans des adipocytes non-obèses isolés en les comparant aux cellules endothéliales de ce même tissu. Ainsi, les adipocytes présentent un profil d'expression des différents composants de la MB relativement similaire de celui des cellules endothéliales (*COL4a1*, *LAMC1*, *Nid-1* et *Perlecan*). Les chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 5$ du collagène IV n'étant pas ou peu exprimé par les adipocytes et les cellules endothéliales dans le TAB, nos données d'expression génique nous suggère que ces deux types cellulaires exprimant la chaîne $\alpha 1$ qui partage un promoteur bidirectionnel avec la chaîne $\alpha 2$, expriment également cette chaîne et par conséquent produisent le trimère $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ de collagène IV.

Notre analyse d'expression génique comparative de ces deux types cellulaires du TAB nous a permis de démontrer une expression distincte de la protéine SPARC (Secreted Protein, Acidic, Cysteine-Rich) se trouvant significativement plus élevée dans les adipocytes. SPARC est une protéine matricielle contribuant à l'organisation et à l'intégrité des matrices extracellulaires via la modulation des interactions entre composants matriciels et cellule-matrice. Les études *in vitro* ont mis en évidence des propriétés anti-prolifératives et anti-adhésives de SPARC. Ainsi la surexpression de cette protéine dans des cellules en culture leur confère un aspect arrondi résultant du désassemblage de leurs adhésions focales (Lane and Sage, 1990). Cette protéine matricielle influence donc la morphogénèse cellulaire.

2. Remodelage de la Membrane Basale du TAB au cours de l'obésité

La fibrose péricellulaire mise en évidence par le laboratoire autour des adipocytes et des vaisseaux pourrait impliquer une modification de la structure de la MB précédemment décrite. Ainsi, nos résultats révèlent la présence d'un marquage du collagène IV plus important autour des adipocytes et des vaisseaux dans les TAB de sujets obèses. Afin de confirmer cette observation morphologique, l'analyse de l'expression génique des différents composés de la MB cités précédemment démontre une surexpression de chacun de ces éléments dans les adipocytes de sujets obèses (*COL4A1*, *LAMC1*, *NID-1*, *Perlecan/HSPG2*). Dans le cas des cellules endothéliales, cette analyse n'a pas pu être réalisée du fait d'une quantité trop faible de TAsc chez les sujets obèses ne permettant pas d'isoler suffisamment de cellules endothéliales pour les études d'expression.

Un article publié en 2011 mettait en évidence chez des souris délétées pour la protéine SPARC et mis en présence d'un régime gras une augmentation de l'accumulation massive de masse grasse associé à une surexpression des gènes *COL4A1* et *COL4A2* dans le TAB (Nie et al., 2011). Cette augmentation de l'expression des deux chaînes de collagène IV dans le TAB serait à l'origine comme observé dans la rétine de ces mêmes souris d'une désorganisation du réseau de collagène IV et par conséquent de la MB (Yan et al., 2002).

Ainsi, nos données obtenues chez l'Humain suggèrent que l'augmentation de l'expression des différents composés de la MB adipocytaire au cours de l'obésité altérerait l'architecture de cette structure cruciale dans la morphologie et le métabolisme cellulaires. Or une étude non publiée du laboratoire portant sur des souris présentant une mutation sur le gène *COL4A1* (G495V dans CB3) a mis en évidence une accumulation de cette protéine dans le TAB viscéral autour des adipocytes et des cellules endothéliales. D'un point de vue physiologique, cette mutation a des conséquences sur notamment la fonction adipocytaire. En effet, nous avons observé une baisse significative de la sécrétion d'adiponectine par le TAB épидидymaire provenant des souris mutées aboutissant à une hypo-adiponectinémie. Or cette adipokine intervient dans la modulation de l'insulino-sensibilité et ses taux circulants sont réduits au cours de l'obésité. Par conséquent, ces données suggèrent que le remodelage de la MB adipocytaire observée au cours de l'obésité semble avoir un impact sur la fonction endocrine des adipocytes en modulant la sécrétion d'adiponectine.

Une étude récente du laboratoire a démontré que les cellules endothéliales au cours de l'obésité présentent un profil sénescence et pro-inflammatoire (Pellegrinelli et al., 2014a). Or ce phénomène serait lié à un défaut d'interaction avec les péricytes, cellules nourricières et contractiles. La désorganisation de la MB vasculaire située à l'interface entre ces deux types cellulaires pourrait alors contribuer à la perturbation de cette interaction et favoriserait la mise en place du profil sénescence des cellules endothéliales. Des études supplémentaires seraient nécessaires notamment la mesure des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-6 permettant de déterminer l'état inflammatoire du TAB de ces souris mutées pour le collagène IV et non soumise à un régime gras.

II. Les conséquences de l'altération de l'expression du collagène IV dans le TAB sur l'insulinosensibilité

Notre travail soulève la question de l'impact de cette désorganisation de la MB du TAB sur la physiopathologie de l'obésité et de ses comorbidités.

Dans un premier groupe de sujets modérément obèses présentant une altération de leur glycémie à jeun mais non traités, nous avons mesuré l'expression du collagène IV dans leur TAsc. Un grand nombre de paramètres cliniques de cette population étaient connus et l'absence de traitement nous affranchissait d'un effet lié aux anti-diabétiques nous évitant tout artefact ou mauvaises interprétations de nos résultats. Par des études corrélatives, nous avons mis en évidence une association entre l'expression génique du collagène IV et les données cliniques permettant d'évaluer l'insulino-résistance et la fonction pancréatique de chaque individu. Aucune des autres données cliniques (masse grasse, Acides Gras Libres...) dans cette population n'est corrélée à l'expression du collagène IV.

La chirurgie bariatrique, outre son effet sur la perte de poids, est un traitement de choix dans la résolution des comorbidités associées à l'obésité comme l'insulinorésistance. Néanmoins, l'amélioration de l'ensemble des paramètres cliniques est variable selon les individus. Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette variabilité ne sont pas encore totalement compris.

Or nous avons constaté dans une population de sujets obèses non-diabétiques mais présentant une insulinorésistance ($\text{HOMA-IR} > 2,4$), que l'expression génique du collagène IV dans le TAsc diminuait après une perte de poids induite par la chirurgie bariatrique. Cependant comme pour les paramètres cliniques, cette baisse de l'expression du collagène IV n'est pas homogène. Nous avons donc voulu déterminer s'il existait une association entre le maintien d'un réseau de collagène IV altéré et une résistance à la résolution de certaines comorbidités après intervention chirurgicale. Ainsi, nos résultats ont permis de mettre en évidence que les sujets dont l'expression du collagène IV dans le TAsc diminue le plus améliorent le mieux leur insulino-résistance. Cette relation suggère qu'une altération du réseau du collagène IV dans le TAB maintenu à la suite de la chirurgie bariatrique est associée à la

non-résolution de l'insulino-résistance. Néanmoins, nos données ne permettent pas de déterminer précisément quelle relation causale et cinétique existe entre ces deux évènements pathologiques.

Cependant des études faites sur le rein ont démontré que l'insulinorésistance influençait l'altération structurelle de la MB glomérulaire. En effet, la délétion du récepteur à l'insuline ciblant les podocytes dans un modèle de souris induit des modifications histologiques glomérulaires caractéristiques de la néphropathie diabétique (Welsh et al., 2010). L'une de ces modifications est l'accumulation pathologique de collagène IV. Ces données suggèrent que l'insulino-résistance cellulaire favoriserait l'altération du réseau de collagène IV dans le glomérule rénale par des mécanismes moléculaires encore non décrits.

Or au cours de l'obésité, l'adipocyte développe une résistance à l'insuline. Ce processus pourrait alors comme dans le cas des podocytes favoriser la surexpression et la surproduction de collagène IV formant un réseau non conventionnel s'accumulant autour de l'adipocyte. Ce processus pathologique serait alors une des causes de l'altération de la fonction adipocytaire.

III. Des acteurs moléculaires distincts impliqués dans l'altération du réseau de collagène IV adipocytaire et vasculaire

Afin de mieux comprendre le remodelage et la désorganisation de la MB du TAB au cours de l'obésité, il nous a semblé nécessaire d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de ce processus pathologique.

Le TGF β 1 est un facteur de croissance connu comme inducteur de l'expression du collagène IV dans de nombreux types cellulaires comme les cellules mésangiales ou les cellules endothéliales (Neubauer et al., 1999; Ziyadeh, 2004). Au cours de l'obésité, il a été noté que l'expression de ce facteur de croissance dans le TA était positivement corrélée à l'IMC (Alessi et al., 2000).

Les TGF β sont regroupés dans une famille de facteur de croissance dans laquelle trois isoformes ont été identifiées: les TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3. Chacune de ces molécules possède un rôle qui lui est propre. Des trois isoformes, le TGF β 1 a été le plus étudié et reconnu pour son activité pro-fibrotique majeur (Massagué, 2012).

Dans notre étude, nous confirmons que ce facteur de croissance favorise dans les cellules endothéliales isolées du TA, l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse fibro-inflammatoire. En particulier, le collagène IV est fortement induit dans les cellules endothéliales

traitées. En revanche, le TGFβ1 n'induit pas *in vitro* de modifications de l'expression du collagène IV au niveau dans les adipocytes matures. Malgré une réponse inflammatoire notable, la réponse fibrotique dans ce type cellulaire est beaucoup moins marquée que dans les cellules endothéliales. Après analyse de données de puces à ADN obtenues par le laboratoire, nous avons observé qu'une seconde isoforme du TGFβ était bien exprimé dans le TAB : le TGFβ3. Encore peu d'études ont décrit les effets de ce facteur de croissance sur la réponse fibrotique des cellules. De fait, nous démontrons alors pour la première fois que l'effet du TGFβ3 sur les cellules endothéliales et les adipocytes est relativement similaire aux résultats précédents obtenus avec le TGFβ1. En effet, en présence de TGFβ3, les cellules endothéliales du TAB développent une réponse fibro-inflammatoire importante alors que dans les adipocytes, malgré l'induction de gènes pro-inflammatoires, la réponse fibrotique reste faible. Par conséquent, nos données obtenues par des expériences *in vitro* soulèvent les effets que pourraient avoir deux isoformes de la famille des TGFβ, le TGFβ1 et le TGFβ3 sur l'altération du réseau de collagène IV de la MB vasculaire. Toutefois, ces deux acteurs moléculaires ne semblent pas avoir le moindre impact sur l'expression du collagène IV dans l'adipocyte. Il semblerait alors que la désorganisation de la MB adipocytaire et vasculaire résultent d'acteurs moléculaires distincts.

Les études du promoteur bidirectionnel des gènes *COL4A1/COL4A2* ont mis en évidence la présence d'un élément de réponse au facteur de transcription Smad1 (Abe et al., 2004). Cette protéine intracellulaire est le médiateur de la signalisation de nombreuses molécules de la superfamille des TGFβ. Afin d'identifier précisément le ou les acteurs moléculaires impliqués dans l'altération du réseau de collagène IV dans l'adipocyte, nous avons testé les effets d'une autre molécule appartenant à cette superfamille, l'Activine A. Cette molécule était d'autant plus un médiateur de choix qu'elle avait déjà été mis en évidence pour son rôle dans la physiopathologie du TAB (Dani, 2013). Néanmoins, malgré son action connue sur les préadipocytes (Keophiphath et al., 2009), nous ne relevons ici aucun effet notable ni pro-inflammatoire, ni fibrotique sur les adipocytes matures en

culture. Néanmoins, la superfamille des TGF β comprend de nombreux autres facteurs ayant des effets multiples et distincts selon le type cellulaire impliqué. Récemment, un autre de ses membres, le BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein 4) a été impliqué dans l'induction de l'expression des gènes *COL4A1*/*COL4A2* au niveau du glomérule rénal murin (Matsubara et al., 2015). Des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer précisément si BMP4, révélée récemment pour son action anti-inflammatoire sur des préadipocytes différenciés humains (Baraban et al., 2015), pouvait être mis en cause dans la désorganisation de la MB adipocytaire observée au cours de l'obésité.

Après avoir mis en évidence une relation étroite entre l'altération du métabolisme glucidique et l'évolution de l'expression du collagène IV dans le TAB, nous avons testé les effets des AGE (Advanced Glycation End products) sur la MB adipocytaire. Les AGE sont des produits issus de la réaction non-enzymatique de l'ajout de glucides sur des protéines dans un environnement diabétique. Ces molécules induisent dans des cellules du glomérule rénal l'expression du gène *COL4A1* (Ha et al., 2009; Yang et al., 1994). Nous n'avons observé aucun effet de ces molécules sur les adipocytes matures. Toutefois, d'autres mécanismes moléculaires se mettent en place comme la voie des polyols, des hexosamines et celle des PKC (Proteine Kinase C) amplifiant la réponse tissulaire à une hyperglycémie chronique. Toutes ces voies sont intimement liées les unes aux autres (Figure 25) conduisant au développement pathologique des tissus. La voie des PKC est au carrefour des nombreuses voies induites par la glucotoxicité et est associée à de nombreuses altérations tissulaires fonctionnelles. Une sur-expression du collagène IV dans des cellules mésangiales résulte de l'activation de cette enzyme. En effet, *in vitro*, la présence d'un agoniste des PKC, un ester de phorbol (le phorbol-12-myristate-13-acétate) dans des cellules mésangiales induit l'expression de ce composé majeur de la MB (Fumo et al., 1994). Par conséquent, il serait donc intéressant de préciser, à l'aide d'agonistes des PKC, les effets de l'altération du métabolisme glucidique sur le réseau de collagène IV de l'adipocyte mature afin de déterminer si ces voies contribuent à la sur-expression du collagène IV dans ce type cellulaire.

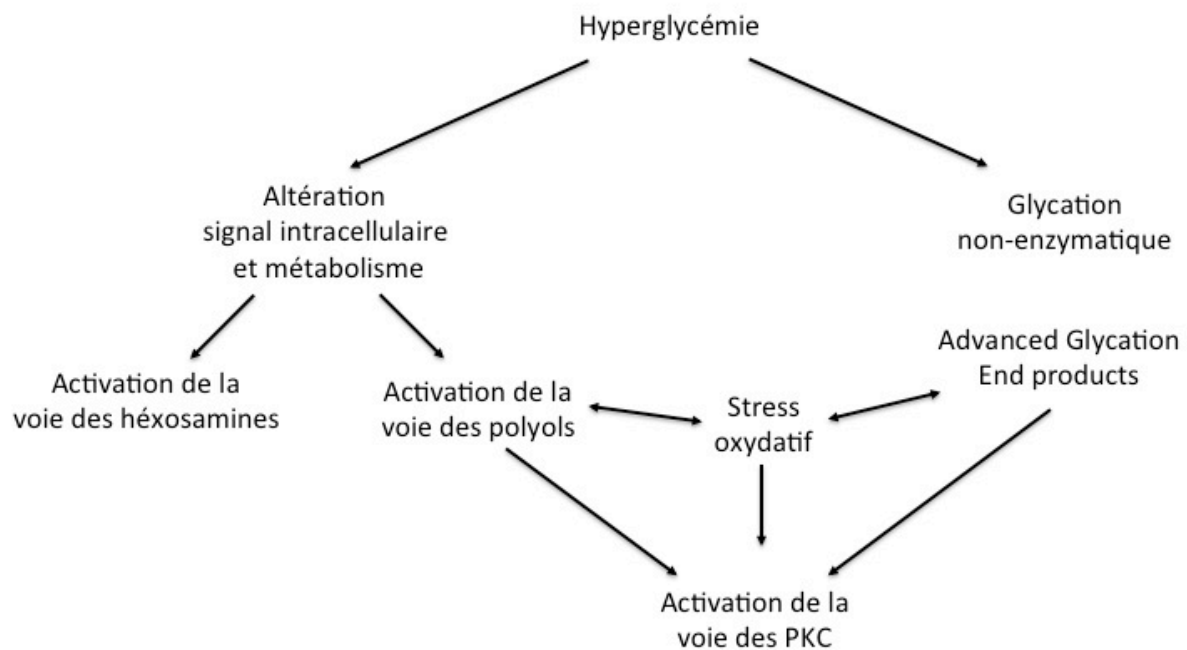


Figure 25: Voies pathologiques de l'hyperglycémie (d'après MS Garud. Cur Diab Rev 2014)

L'ensemble de nos analyses *in vitro* ne nous ont pas permis de déterminer précisément quels acteurs moléculaires étaient impliqués dans le remodelage de la MB adipocytaire. Même si le rôle de la MB vasculaire est bien décrit, le rôle conféré à cette structure entourant les adipocytes n'est pas encore élucidé. Des études de délétion du collagène IV chez *C. Elegans* et chez la souris ont révélé que cette protéine était cruciale pour les cellules dans la réponse aux contraintes mécaniques via la transmission des signaux cellules/matrice interstitielle (Guo et al., 1991; Pöschl et al., 2004). L'adipocyte est une cellule en permanence soumise à des tensions mécaniques bidirectionnelles avec une GL en perpétuel remaniement. Or au cours de l'obésité, ce phénomène est amplifié avec d'une part l'accumulation de dépôts fibrotiques exerçant une tension de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et d'autre part l'expansion massive de la gouttelette lipidique soutenant une pression de l'intérieur vers l'extérieur. L'ensemble de ces contraintes mécaniques semble avoir un impact sur la structure et l'activité biologique de l'adipocyte, une cellule maintenant reconnue comme mécano-sensible. Notre laboratoire a récemment mis en évidence par des analyses *in vitro* que la présence d'un environnement fibrotique en contact avec des adipocytes matures en culture tridimensionnelle modifiait leurs fonctions métaboliques et sécrétoires (Pellegrinelli et al., 2014b). Néanmoins,

l'expression du collagène IV adipocytaire n'a pas été mesurée dans des conditions fibrotiques. Par conséquent, il serait nécessaire d'évaluer les conséquences que pourrait avoir un environnement fibrotique sur l'expression et le réseau de collagène IV faisant le lien physique entre les collagènes fibrillaires et la matrice interstitielle. Par ailleurs, les adipocytes au cours de l'obésité sont également soumis à des pressions venant de leur cytoplasme, dues à l'expansion massive de leur GL. Or, d'après la théorie de « l'expandabilité du TAB » (Virtue and Vidal-Puig, 2010), l'adipocyte aurait une capacité de stockage des lipides limités. Lorsque cette limite est atteinte, la cellule peut alors mettre en place différentes stratégies protectrices d'une hypertrophie délétère. L'une de ces stratégies pourrait être un remodelage de sa MB ou tout du moins de son réseau de collagène IV. En effet, en induisant un épaississement dans la structure de cette MEC spécialisée, l'adipocyte produirait une barrière physique arrêtant son hypertrophie mais également restreignant l'entrée des lipides. Toutefois, la vérification de l'effet de l'expansion pathologique de la GL reste encore compliquée à mettre en place expérimentalement. Des études ont tenté de mimer ce processus dans des adipocytes murins 3T3 en culture après enrichissement dans leur milieu d'un lipide, le palmitate. Toutefois, ce type cellulaire possède des GL multiloculaires contrairement aux adipocytes matures. Malgré un enrichissement notable en lipides dans ce type d'adipocytes différenciés *in vitro*, cela ne permet pas de véritablement rendre compte du processus survenant dans des adipocytes matures humains. Aucune étude n'a encore véritablement évalué l'impact que pouvait avoir l'expansion massive de la GL sur l'activité biologique de l'adipocyte humain et sur son architecture. Ainsi, des études transcriptomiques et protéomiques, évaluant l'impact du développement inadéquat de la GL sur l'activité biologique de l'adipocyte et sur son architecture, permettrait de déterminer précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires survenant au cours de cet événement mis en place par la cellule comme moyen de protection.

Conclusion générale

En conclusion, ce travail de thèse étudie une structure extracellulaire encore peu décrite dans le TAB, la Membrane Basale, et met en évidence un nouvel acteur impliqué dans la fibrogénèse de ce tissu. Cette MEC spécialisée, constituée notamment d'un réseau de collagène IV, pourrait participer à la mise en place de la fibrose péri-adipocytaire et périvasculaire associée à l'accumulation d'autres composés de la matrice interstitielle.

En effet, après la mise en évidence par le laboratoire de l'accumulation excessive de collagènes I, III et VI en particulier autour des adipocytes et des vaisseaux dans le TAB de sujets obèses, nous avons démontré la présence d'une altération du réseau de collagène IV entourant les adipocytes et les cellules endothéliales.

Cette désorganisation architecturale a des conséquences dans la mise en place des comorbidités associées à l'obésité. En effet, nous avons mis en évidence une relation étroite entre l'expression du collagène IV dans le TAB et l'insulinorésistance. Par ailleurs, des études ont déjà montré une relation entre ces deux paramètres chez des sujets souffrant de néphropathie et rétinopathie diabétique. L'étude de la relation entre l'expression du collagène IV dans le tissu rénal et l'insulinorésistance a révélé que la désorganisation de la MB était la conséquence de l'altération de la voie insulinique. Des études de cinétiques seraient à envisager afin de déterminer si, dans le TAB, les mêmes mécanismes sont mis en place. Ainsi, sur un groupe de sujets présentant une insulinorésistance, nous pourrions évaluer les effets d'un traitement (metformine ou analogue du GLP-1) améliorant la sensibilité à l'insuline, sur l'expression du collagène IV dans le TAB à différents temps du traitement. Cela nous permettrait alors de déterminer précisément quel est la cause et la conséquence de ces deux événements pathologiques.

Au niveau du tissu rénal, le TGF β 1 est un acteur moléculaire impliqué dans les mécanismes faisant le lien entre l'insulinorésistance et la désorganisation de la MB. Néanmoins, nous avons démontré ici que seules les cellules endothéliales étaient sensibles à l'action pro-fibrotique de ce facteur et à une autre isoforme encore peu étudiée, le TGF β 3. Dans l'adipocyte, nous n'avons pas élucidé les

mécanismes moléculaires à l'origine de ce remodelage. Déterminer les acteurs moléculaires impliqués dans ce processus pathologique est crucial afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires se mettant en place et mieux décrire les événements reliant cette altération du réseau de collagène IV au phénomène de l'insulino-résistance.

Références Bibliographiques

Abdenmour, M., Reggio, S., Le Naour, G., Liu, Y., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Charlotte, F., Bouilliot, J.-L., Torcivia, A., Sasso, M., et al. (2014). Association of Adipose Tissue and Liver Fibrosis with Tissue Stiffness in Morbid Obesity: Links with Diabetes and BMI Loss after Gastric Bypass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc20133253.

Abe, H., Matsubara, T., Iehara, N., Nagai, K., Takahashi, T., Arai, H., Kita, T., and Doi, T. (2004). Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation. *J. Biol. Chem.* 279, 14201–14206.

Abelenda, M., and Puerta, M.L. (1992). Brown adipose tissue thermogenesis in T3-treated rats. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 24, 60–62.

Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., and Grimaldi, P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 268, 17665–17668.

Adapala, V.J., Ward, M., and Ajuwon, K.M. (2012). Adipose tissue biglycan as a potential anti-inflammatory target of sodium salicylate in mice fed a high fat diet. *J. Inflamm. Lond. Engl.* 9, 15.

Adya, R., Tan, B.K., and Randeve, H.S. (2015). Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. *J. Diabetes Res.* 2015, 648239.

Agarwal, A.K., and Garg, A. (2003). Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 14, 214–221.

Aikio, M., Elamaa, H., Vicente, D., Izzi, V., Kaur, I., Seppinen, L., Speedy, H.E., Kaminska, D., Kuusisto, S., Sormunen, R., et al. (2014). Specific collagen XVIII isoforms promote adipose tissue accrual via mechanisms determining adipocyte number and affect fat deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3043–E3052.

Alam, N., Goel, H.L., Zarif, M.J., Butterfield, J.E., Perkins, H.M., Sansoucy, B.G., Sawyer, T.K., and Languino, L.R. (2007). The integrin-growth factor receptor duet. *J. Cell. Physiol.* 213, 649–653.

Alessi, M.C., Bastelica, D., Morange, P., Berthet, B., Leduc, I., Verdier, M., Geel, O., and Juhan-Vague, I. (2000). Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 49, 1374–1380.

Alexander, H.G., and Dugdale, A.E. (1992). Fascial planes within subcutaneous fat in humans.

Eur. J. Clin. Nutr. 46, 903–906.

Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* 116, 217–224.

Apte, S.S. (2004). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 981–985.

Argraves, W.S., Greene, L.M., Cooley, M.A., and Gallagher, W.M. (2003). Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* 4, 1127–1131.

Armstrong, L.C., and Last, J.A. (1995). Rat lysyl hydroxylase: molecular cloning, mRNA distribution and expression in a baculovirus system. *Biochim. Biophys. Acta* 1264, 93–102.

Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 97, 512–523.

Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* 21, 193–215.

Arner, P. (1997). Regional adiposity in man. *J. Endocrinol.* 155, 191–192.

Arner, P., and Spalding, K.L. (2010). Fat cell turnover in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 101–104.

Ashton, N. (1974). Vascular basement membrane changes in diabetic retinopathy. Montgomery lecture, 1973. *Br. J. Ophthalmol.* 58, 344–366.

Aumailley, M., Specks, U., and Timpl, R. (1991). Cell adhesion to type-VI collagen. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 843–847.

Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., and Yayon, A. (1994). Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79, 1005–1013.

Baillargeon, J., and Rose, D.P. (2006). Obesity, adipokines, and prostate cancer (review). *Int. J. Oncol.* 28, 737–745.

Baker, A.H., Edwards, D.R., and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 115, 3719–3727.

Banerjee, S.S., Feinberg, M.W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R.L., Denking, D.J., Kawahara, R., Hauner, H., and Jain, M.K. (2003). The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 2581–2584.

Banse, X., Sims, T.J., and Bailey, A.J. (2002). Mechanical properties of adult vertebral cancellous bone: correlation with collagen intermolecular cross-links. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 17, 1621–1628.

Baraban, E., Chavakis, T., Hamilton, B.S., Sales, S., Wabitsch, M., Bornstein, S.R., and Ehrhart-Bornstein, M. (2015). Anti-inflammatory properties of bone morphogenetic protein 4 in human adipocytes. *Int. J. Obes.* 2005.

Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4, 585–595.

Basdevant, A. (2006). [Obesity epidemic: origins and consequences]. *C. R. Biol.* 329, 562–569; discussion 653–655.

Bax, D.V., Bernard, S.E., Lomas, A., Morgan, A., Humphries, J., Shuttleworth, C.A., Humphries, M.J., and Kielty, C.M. (2003). Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J. Biol. Chem.* 278, 34605–34616.

Bedell-Hogan, D., Trackman, P., Abrams, W., Rosenbloom, J., and Kagan, H. (1993). Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 10345–10350.

Bell, R.M., and Coleman, R.A. (1980). Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 459–487.

Berg, A.H., and Scherer, P.E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 96, 939–949.

Berman, W.H., Berman, E.R., Heymsfield, S., Fauci, M., and Ackerman, S. (1993). The effect of psychiatric disorders on weight loss in obesity clinic patients. *Behav. Med. Wash. DC* 18, 167–172.

Berry, R., and Rodeheffer, M.S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.* 15, 302–308.

Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., et al. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 61, 2238–2247.

Birsoy, K., Chen, Z., and Friedman, J. (2008). Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab.* 7, 339–347.

Bishop, J.R., Passos-Bueno, M.R., Fong, L., Stanford, K.I., Gonzales, J.C., Yeh, E., Young, S.G., Bensadoun, A., Witztum, J.L., Esko, J.D., et al. (2010). Deletion of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan type XVIII collagen causes hypertriglyceridemia in mice and humans. *PLoS One* 5, e13919.

Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E.M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Kim, J.K., Höök, M., et al. (2004). Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin

cytoskeleton and focal adhesions through $\alpha 2\beta 1$ integrin. *J. Cell Biol.* 166, 97–109.

Björntorp, P., and Sjöström, L. (1978). Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism.* 27, 1853–1865.

Black, R.A., Durie, F.H., Otten-Evans, C., Miller, R., Slack, J.L., Lynch, D.H., Castner, B., Mohler, K.M., Gerhart, M., Johnson, R.S., et al. (1996). Relaxed specificity of matrix metalloproteinases (MMPs) and TIMP insensitivity of tumor necrosis factor- α (TNF- α) production suggest the major TNF- α converting enzyme is not an MMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 400–405.

Bloch, W., Forsberg, E., Lentini, S., Brakebusch, C., Martin, K., Krell, H.W., Weidle, U.H., Addicks, K., and Fässler, R. (1997). Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J. Cell Biol.* 139, 265–278.

Bonfanti, L., Mironov, A.A., Martínez-Menárguez, J.A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H.J., Mironov, A.A., and Luini, A. (1998). Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95, 993–1003.

Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J. Cell Biol.* 130, 503–506.

Bornstein, P. (2009). Matricellular proteins: an overview. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 163–165.

Bouloumié, A., Drexler, H.C., Lafontan, M., and Busse, R. (1998). Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ. Res.* 83, 1059–1066.

Bouloumié, A., Lolmède, K., Sengenès, C., Galitzky, J., and Lafontan, M. (2002). Angiogenesis in adipose tissue. *Ann. Endocrinol.* 63, 91–95.

Boutaud, A., Borza, D.B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K.O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M.E., and Hudson, B.G. (2000). Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.* 275, 30716–30724.

Bressan, G.M., Daga-Gordini, D., Colombatti, A., Castellani, I., Marigo, V., and Volpin, D. (1993). Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J. Cell Biol.* 121, 201–212.

Brew, K., Dinakarpanian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 267–283.

Brown, J.C., Sasaki, T., Göhring, W., Yamada, Y., and Timpl, R. (1997). The C-terminal domain V of perlecan promotes $\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem. FEBS* 250, 39–46.

Bruns, R.R., Press, W., Engvall, E., Timpl, R., and Gross, J. (1986). Type VI collagen in

extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils: identification by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 103, 393–404.

Buchwald, H., Estok, R., Fahrbach, K., Banel, D., Jensen, M.D., Pories, W.J., Bantle, J.P., and Sledge, I. (2009). Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* 122, 248–256.e5.

Burgeson, R.E. (1993). Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 101, 252–255.

Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 487–525.

Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., and Thun, M.J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 348, 1625–1638.

Campbell, K.P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80, 675–679.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.

Carafoli, F., and Hohenester, E. (2013). Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 2187–2194.

Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusi, A.J., et al. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13018–13023.

Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K.D., Voelker, T., and Farese, R.V. (2001). Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Biol. Chem.* 276, 38870–38876.

Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Ramírez, B., Rotellar, F., Valentí, V., Silva, C., Gil, M.J., Salvador, J., and Frühbeck, G. (2012). Increased tenascin C and Toll-like receptor 4 levels in visceral adipose tissue as a link between inflammation and extracellular matrix remodeling in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1880–E1889.

Cavaldesi, M., Macchia, G., Barca, S., Defilippi, P., Tarone, G., and Petrucci, T.C. (1999). Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J. Neurochem.* 72, 1648–1655.

Chakrabarti, S., and Patel, K.D. (2005). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp. Lung Res.* 31, 599–621.

- Chapman, A.B., Knight, D.M., and Ringold, G.M. (1985). Glucocorticoid regulation of adipocyte differentiation: hormonal triggering of the developmental program and induction of a differentiation-dependent gene. *J. Cell Biol.* *101*, 1227–1235.
- Chawla, A., Nguyen, K.D., and Goh, Y.P.S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 738–749.
- Choi, Y.H., Park, S., Hockman, S., Zmuda-Trzebiatowska, E., Svennelid, F., Haluzik, M., Gavrilova, O., Ahmad, F., Pepin, L., Napolitano, M., et al. (2006). Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice. *J. Clin. Invest.* *116*, 3240–3251.
- Christensen, R., Kristensen, P.K., Bartels, E.M., Bliddal, H., and Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* *370*, 1706–1713.
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., et al. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* *392*, 398–401.
- Clerico, A., Giannoni, A., Vittorini, S., and Passino, C. (2011). Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *301*, H12–H20.
- Colige, A., Li, S.W., Sieron, A.L., Nusgens, B.V., Prockop, D.J., and Lapière, C.M. (1997). cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 2374–2379.
- Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C.A., Van Beeumen, J., Li, S.-W., Prockop, D.J., Lapiere, C.M., and Nusgens, B.V. (2002). Cloning and characterization of ADAMTS-14, a novel ADAMTS displaying high homology with ADAMTS-2 and ADAMTS-3. *J. Biol. Chem.* *277*, 5756–5766.
- Colombatti, A., Doliana, R., Bot, S., Canton, A., Mongiat, M., Mungiguerra, G., Paron-Cilli, S., and Spessotto, P. (2000). The EMILIN protein family. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *19*, 289–301.
- Contard, P., Jacobs, L., Perlish, J.S., and Fleischmajer, R. (1993). Collagen fibrillogenesis in a three-dimensional fibroblast cell culture system. *Cell Tissue Res.* *273*, 571–575.
- Corson, G.M., Charbonneau, N.L., Keene, D.R., and Sakai, L.Y. (2004). Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics* *83*, 461–472.
- Costello, I., Biondi, C.A., Taylor, J.M., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2009). Smad4-dependent pathways control basement membrane deposition and endodermal cell

migration at early stages of mouse development. *BMC Dev. Biol.* 9, 54.

Cottam, D.R., Mattar, S.G., Barinas-Mitchell, E., Eid, G., Kuller, L., Kelley, D.E., and Schauer, P.R. (2004). The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes. Surg.* 14, 589–600.

Couchman, J.R., and Pataki, C.A. (2012). An introduction to proteoglycans and their localization. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 60, 885–897.

Crandall, D.L., Hausman, G.J., and Kral, J.G. (1997). A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirc. N. Y. N* 1994 4, 211–232.

Cryer, A., and Van, R.L. (1982). Characterization of the collagen types synthesized by human and rat adipocyte precursors in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 12, 235–238.

Csiszar, K. (2001). Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 70, 1–32.

Cui, H., Freeman, C., Jacobson, G.A., and Small, D.H. (2013). Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 65, 108–120.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517.

Czech, M.P. (2003). Insulin's expanding control of forkheads. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 11198–11200.

Daley, W.P., Peters, S.B., and Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.* 121, 255–264.

Dallas, S.L., Chen, Q., and Sivakumar, P. (2006). Dynamics of assembly and reorganization of extracellular matrix proteins. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75, 1–24.

Dani, C. (2013). Activins in adipogenesis and obesity. *Int. J. Obes.* 2005 37, 163–166.

Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* 13, 2905–2927.

Davis, G.E., Bayless, K.J., Davis, M.J., and Meininger, G.A. (2000). Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. Pathol.* 156, 1489–1498.

Deutzmann, R., Aumailley, M., Wiedemann, H., Pysny, W., Timpl, R., and Edgar, D. (1990). Cell adhesion, spreading and neurite stimulation by laminin fragment E8 depends on maintenance of secondary and tertiary structure in its rod and globular domain. *Eur. J.*

Biochem. FEBS *191*, 513–522.

Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J.-D., et al. (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* *59*, 2817–2825.

Divoux, A., Moutel, S., Poitou, C., Lacasa, D., Veyrie, N., Aissat, A., Arock, M., Guerre-Millo, M., and Clément, K. (2012). Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *97*, E1677–E1685.

Doane, K.J., Yang, G., and Birk, D.E. (1992). Corneal cell-matrix interactions: type VI collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblasts. *Exp. Cell Res.* *200*, 490–499.

Doerge, K.J., and Fessler, J.H. (1986). Folding of carboxyl domain and assembly of procollagen I. *J. Biol. Chem.* *261*, 8924–8935.

Dolan, M., Horchar, T., Rigatti, B., and Hassell, J.R. (1997). Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis. *J. Biol. Chem.* *272*, 4316–4322.

Doliana, R., Bot, S., Bonaldo, P., and Colombatti, A. (2000). EMI, a novel cysteine-rich domain of EMILINs and other extracellular proteins, interacts with the gC1q domains and participates in multimerization. *FEBS Lett.* *484*, 164–168.

Domínguez, P.M., and Ardavín, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* *234*, 90–104.

Dong, S., Cole, G.J., and Halfter, W. (2003). Expression of Collagen XVIII and Localization of Its Glycosaminoglycan Attachment Sites. *J. Biol. Chem.* *278*, 1700–1707.

Dubern, B., and Clément, K. (2007). [Genetic aspects of obesity]. *Presse Médicale Paris Fr.* *1983* *36*, 1598–1605.

Duncan, K.G., Fessler, L.I., Bächinger, H.P., and Fessler, J.H. (1983). Procollagen IV. Association to tetramers. *J. Biol. Chem.* *258*, 5869–5877.

Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* *339*, 259–268.

Durbeej, M., Henry, M.D., Ferletta, M., Campbell, K.P., and Ekblom, P. (1998). Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *46*, 449–457.

Eberth, C.J., (1871). *Handbuch der lehre von den gewebe und tiere*. Leipzig.

Egan, J.J., Greenberg, A.S., Chang, M.K., Wek, S.A., Moos, M.C., and Londos, C. (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 8537–8541.

El-Jack, A.K., Hamm, J.K., Pilch, P.F., and Farmer, S.R. (1999). Reconstitution of insulin-

sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J. Biol. Chem.* 274, 7946–7951.

Endres, K., and Fahrenholz, F. (2010). Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope? *FEBS J.* 277, 1585–1596.

Engel, H., Steinert, H., Buck, A., Berthold, T., Huch Böni, R.A., and von Schulthess, G.K. (1996). Whole-body PET: physiological and artifactual fluorodeoxyglucose accumulations. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 37, 441–446.

Engel, J., Furthmayr, H., Odermatt, E., von der Mark, H., Aumailley, M., Fleischmajer, R., and Timpl, R. (1985). Structure and macromolecular organization of type VI collagen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 460, 25–37.

Erickson, A.C., and Couchman, J.R. (2000). Still More Complexity in Mammalian Basement Membranes. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1291–1306.

Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1993). Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 82–87.

Eto, H., Suga, H., Matsumoto, D., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., and Yoshimura, K. (2009). Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 124, 1087–1097.

Ferguson, M.W.J., and O’Kane, S. (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359, 839–850.

Fernandes, R.J., Hirohata, S., Engle, J.M., Colige, A., Cohn, D.H., Eyre, D.R., and Apte, S.S. (2001). Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J. Biol. Chem.* 276, 31502–31509.

Ferrante, A.W. (2013). The immune cells in adipose tissue. *Diabetes Obes. Metab.* 15 Suppl 3, 34–38.

Fessler, L.I., and Fessler, J.H. (1974). Protein assembly of procollagen and effects of hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 249, 7637–7646.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A.B., Benoist, C., Shoelson, S., et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 15, 930–939.

Finnis, M.L., and Gibson, M.A. (1997). Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) binds to the pepsin-resistant domain of the alpha3(VI) chain of type VI collagen. *J. Biol. Chem.* 272, 22817–22823.

Fisher, F.M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.

- Fleck, S.J. (1983). Body composition of elite American athletes. *Am. J. Sports Med.* *11*, 398–403.
- Fleischmajer, R., Gay, S., Meigel, W.N., and Perlish, J.S. (1978). Collagen in the cellular and fibrotic stages of scleroderma. *Arthritis Rheum.* *21*, 418–428.
- Fleischmajer, R., Perlish, J.S., Burgeson, R.E., Shaikh-Bahai, F., and Timpl, R. (1990). Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *580*, 161–175.
- Fock, K.M., and Khoo, J. (2013). Diet and exercise in management of obesity and overweight. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *28 Suppl 4*, 59–63.
- Folli, F., Guzzi, V., Perego, L., Coletta, D.K., Finzi, G., Placidi, C., La Rosa, S., Capella, C., Socci, C., Lauro, D., et al. (2010). Proteomics reveals novel oxidative and glycolytic mechanisms in type 1 diabetic patients' skin which are normalized by kidney-pancreas transplantation. *PLoS One* *5*, e9923.
- Fonović, M., and Turk, B. (2014). Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 2560–2570.
- Fonseca-Alaniz, M.H., Takada, J., Alonso-Vale, M.I.C., and Lima, F.B. (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J. Pediatr. (Rio J.)* *83*, S192–S203.
- Fox, J.W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., and Engel, J. (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* *10*, 3137–3146.
- Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E.S.G., and Kastelein, J.J.P. (2011). Obesity and dyslipidemia. *Med. Clin. North Am.* *95*, 893–902.
- Franz, M., Brehm, B.R., Richter, P., Gruen, K., Neri, D., Kosmehl, H., Hekmat, K., Renner, A., Gummert, J., Figulla, H.R., et al. (2010). Changes in extra cellular matrix remodelling and re-expression of fibronectin and tenascin-C splicing variants in human myocardial tissue of the right atrial auricle: implications for a targeted therapy of cardiovascular diseases using human SIP format antibodies. *J. Mol. Histol.* *41*, 39–50.
- Franzke, C.-W., Tasanen, K., Schäcke, H., Zhou, Z., Tryggvason, K., Mauch, C., Zigrino, P., Sunnarborg, S., Lee, D.C., Fahrenholz, F., et al. (2002). Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* *21*, 5026–5035.
- Franzke, C.-W., Bruckner, P., and Bruckner-Tuderman, L. (2005). Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J. Biol. Chem.* *280*, 4005–4008.
- Freedman Silvernail, J., Milner, C.E., Thompson, D., Zhang, S., and Zhao, X. (2013). The influence of body mass index and velocity on knee biomechanics during walking. *Gait Posture* *37*, 575–579.

- Frey, H., Schroeder, N., Manon-Jensen, T., Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2013). Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.* **280**, 2165–2179.
- Freytag, S.O., Paielli, D.L., and Gilbert, J.D. (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein α promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev.* **8**, 1654–1663.
- Friedenwald, J.S. (1953). Diabetic retinopathy. *Diabetes* **2**, 237–240.
- Fukai, N., Eklund, L., Marneros, A.G., Oh, S.P., Keene, D.R., Tamarkin, L., Niemelä, M., Ilves, M., Li, E., Pihlajaniemi, T., et al. (2002). Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. *EMBO J.* **21**, 1535–1544.
- Fukami, K., Yamagishi, S.-I., Coughlan, M.T., Harcourt, B.E., Kantharidis, P., Thallas-Bonke, V., Okuda, S., Cooper, M.E., and Forbes, J.M. (2014). Ramipril inhibits AGE-RAGE-induced matrix metalloproteinase-2 activation in experimental diabetic nephropathy. *Diabetol. Metab. Syndr.* **6**, 86.
- Fukumura, D., Ushiyama, A., Duda, D.G., Xu, L., Tam, J., Krishna, V., Chatterjee, K., Garkavtsev, I., and Jain, R.K. (2003). Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ. Res.* **93**, e88–e97.
- Fumo, P., Kuncio, G.S., and Ziyadeh, F.N. (1994). PKC and high glucose stimulate collagen $\alpha 1$ (IV) transcriptional activity in a reporter mesangial cell line. *Am. J. Physiol.* **267**, F632–F638.
- Gaich, G., Chien, J.Y., Fu, H., Glass, L.C., Deeg, M.A., Holland, W.L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H.K., and Moller, D.E. (2013). The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab.* **18**, 333–340.
- Garton, A.J., Campbell, D.G., Cohen, P., and Yeaman, S.J. (1988). Primary structure of the site on bovine hormone-sensitive lipase phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **229**, 68–72.
- Gee, S.H., Blacher, R.W., Douville, P.J., Provost, P.R., Yurchenco, P.D., and Carbonetto, S. (1993). Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J. Biol. Chem.* **268**, 14972–14980.
- Ghorbani, M., Claus, T.H., and Himms-Hagen, J. (1997). Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a $\beta 3$ -adrenoceptor agonist. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 121–131.
- Goh, F.G., Piccinini, A.M., Krausgruber, T., Udalova, I.A., and Midwood, K.S. (2010). Transcriptional regulation of the endogenous danger signal tenascin-C: a novel autocrine loop in inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* **184**, 2655–2662.

- Göhring, W., Sasaki, T., Heldin, C.H., and Timpl, R. (1998). Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *Eur. J. Biochem. FEBS* 255, 60–66.
- Goldberg, B., and Sherr, C.J. (1973). Secretion and extracellular processing of procollagen by cultured human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 361–365.
- Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2006). UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E350–E357.
- Gray, S., Feinberg, M.W., Hull, S., Kuo, C.T., Watanabe, M., Sen-Banerjee, S., DePina, A., Haspel, R., and Jain, M.K. (2002). The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 277, 34322–34328.
- Gray, W.R., Sandberg, L.B., and Foster, J.A. (1973). Molecular model for elastin structure and function. *Nature* 246, 461–466.
- Green, H., Morikawa, M., and Nixon, T. (1985). A dual effector theory of growth-hormone action. *Differ. Res. Biol. Divers.* 29, 195–198.
- Grimm, P.C., Nickerson, P., Gough, J., McKenna, R., Stern, E., Jeffery, J., and Rush, D.N. (2003). Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14, 1662–1668.
- Gritsenko, P.G., Ilina, O., and Friedl, P. (2012). Interstitial guidance of cancer invasion. *J. Pathol.* 226, 185–199.
- Grün, F., and Blumberg, B. (2006). Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147, S50–S55.
- Gubler, M.C. (2008). Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 4, 24–37.
- Guo, X.D., Johnson, J.J., and Kramer, J.M. (1991). Embryonic lethality caused by mutations in basement membrane collagen of *C. elegans*. *Nature* 349, 707–709.
- Ha, T.-S., Hong, E.-J., Ahn, E.-M., and Ahn, H.-Y. (2009). Regulation of type IV collagen alpha chains of glomerular epithelial cells in diabetic conditions. *J. Korean Med. Sci.* 24, 837–843.
- Haas, M. (2009). Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 133, 224–232.
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., and Cole, G.J. (1998). Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 273, 25404–25412.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., and Sorokin, L.M. (2005).

- Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* **85**, 979–1000.
- Hany, T.F., Gharehpapagh, E., Kamel, E.M., Buck, A., Himms-Hagen, J., and von Schulthess, G.K. (2002). Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **29**, 1393–1398.
- Harman-Boehm, I., Blüher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Klötting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., et al. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2240–2247.
- Hartigan, N., Garrigue-Antar, L., and Kadler, K.E. (2003). Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1). Identification of the minimal domain structure for procollagen C-proteinase activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 18045–18049.
- Hasslacher, C., and Wahl, P. (1980). Influence of diabetes control on synthesis of protein and basement membrane collagen in isolated glomeruli of diabetic rats. *Res. Exp. Med. Z. Für Gesamte Exp. Med. Einschl. Exp. Chir.* **176**, 247–253.
- Hausman, G.J., and Richardson, L.R. (1982). Histochemical and ultrastructural analysis of developing adipocytes in the fetal pig. *Acta Anat. (Basel)* **114**, 228–247.
- Hayashi, K., Madri, J.A., and Yurchenco, P.D. (1992). Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan. *J. Cell Biol.* **119**, 945–959.
- Hayashi, K., Fong, K.S.K., Mercier, F., Boyd, C.D., Csiszar, K., and Hayashi, M. (2004). Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *J. Mol. Histol.* **35**, 845–855.
- Hemler, M.E., and Lobb, R.R. (1995). The leukocyte beta 1 integrins. *Curr. Opin. Hematol.* **2**, 61–67.
- Henderson, M., Polewski, R., Fanning, J.C., and Gibson, M.A. (1996). Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-filament structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by the rotary shadowing technique. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **44**, 1389–1397.
- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Basdevant, A., Stich, V., Viguerie, N., et al. (2008). Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* **9**, R14.
- Henry, M.D., and Campbell, K.P. (1998). A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* **95**, 859–870.

- Hessle, H., and Engvall, E. (1984). Type VI collagen. Studies on its localization, structure, and biosynthetic form with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 259, 3955–3961.
- Hildebrand, A., Romarís, M., Rasmussen, L.M., Heinegård, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., and Ruoslahti, E. (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem. J.* 302 (Pt 2), 527–534.
- Hirsch, J., and Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin. Endocrinol. Metab.* 5, 299–311.
- Hoffman, B.B., Sharma, K., Zhu, Y., and Ziyadeh, F.N. (1998). Transcriptional activation of transforming growth factor-beta1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. *Kidney Int.* 54, 1107–1116.
- Hodge, A.J., and Petrushka J.A. (1963) Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. In *Aspect of Protein Structure*. Edited by Ramachandran GN. New York: Academic Press; 289-300
- Holmes, C., and Stanford, W.L. (2007). Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 1339–1347.
- Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., and Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur. J. Biochem. FEBS* 259, 917–925.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Hou, G., Vogel, W., and Bendeck, M.P. (2001). The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J. Clin. Invest.* 107, 727–735.
- Hou, G., Vogel, W.F., and Bendeck, M.P. (2002). Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ. Res.* 90, 1147–1149.
- Huang, H., Song, T.-J., Li, X., Hu, L., He, Q., Liu, M., Lane, M.D., and Tang, Q.-Q. (2009). BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12670–12675.
- Huang, W., Chiquet-Ehrismann, R., Moyano, J.V., Garcia-Pardo, A., and Orend, G. (2001). Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res.* 61, 8586–8594.
- Huber, J., Löffler, M., Bilban, M., Reimers, M., Kadl, A., Todoric, J., Zeyda, M., Geyeregger, R., Schreiner, M., Weichhart, T., et al. (2007). Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Int. J. Obes.* 2005 31,

1004–1013.

Hudson, B.G. (2004). The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15, 2514–2527.

Hudson, B.G., Reeders, S.T., and Tryggvason, K. (1993). Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Biol. Chem.* 268, 26033–26036.

Hudson, B.G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., and Neilson, E.G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N. Engl. J. Med.* 348, 2543–2556.

Hulmes, D.J.S. (2002). Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.* 137, 2–10.

Hume, D.A. (2015). The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Front. Immunol.* 6, 370.

Hung, S.-C., Chang, C.-F., Ma, H.-L., Chen, T.-H., and Low-Tone Ho, L. (2004). Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Gene* 340, 141–150.

Hutley, L.J., Herington, A.C., Shurety, W., Cheung, C., Vesey, D.A., Cameron, D.P., and Prins, J.B. (2001). Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1037–E1044.

Hutter, H., Vogel, B.E., Plenefisch, J.D., Norris, C.R., Proenca, R.B., Spieth, J., Guo, C., Mastwal, S., Zhu, X., Scheel, J., et al. (2000). Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* 287, 989–994.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.

Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216–1219.

Hynes, R.O., and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a004903.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355, 696–702.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Milatovich, A., Ozcelik, T., Yang, B., Koepnick, K., Francke, U., and Campbell, K.P. (1993). Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1651–1657.

Ido, H., Nakamura, A., Kobayashi, R., Ito, S., Li, S., Futaki, S., and Sekiguchi, K. (2007). The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of

the laminin gamma chains in integrin binding by laminins. *J. Biol. Chem.* 282, 11144–11154.

Iozzo, R.V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 609–652.

Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bächinger, H.P., and Nagata, K. (2006). Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell* 17, 2346–2355.

Isola, L.M., Zhou, S.L., Kiang, C.L., Stump, D.D., Bradbury, M.W., and Berk, P.D. (1995). 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9866–9870.

Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., and Penttinen, R. (2009). Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 61, 198–223.

Jenkins, G. (2008). The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1068–1078.

Jensen, M.D., and Nielsen, S. (2007). Insulin dose response analysis of free fatty acid kinetics. *Metabolism.* 56, 68–76.

Jensen, S.A., Reinhardt, D.P., Gibson, M.A., and Weiss, A.S. (2001). Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* 276, 39661–39666.

Jiang, X., and Couchman, J.R. (2003). Perlecan and tumor angiogenesis. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 51, 1393–1410.

Jimenez, S.A., Dehm, P., and Prockop, D.J. (1971). Further evidence for a transport form of collagen. Its extrusion and extracellular conversion to tropocollagen in embryonic tendon. *FEBS Lett.* 17, 245–248.

Juan, Y.-S., Chuang, S.-M., Long, C.-Y., Lin, R.-J., Liu, K.-M., Wu, W.-J., and Huang, C.-H. (2012). Protein kinase C inhibitor prevents renal apoptotic and fibrotic changes in response to partial ureteric obstruction. *BJU Int.* 110, 283–292.

Juva, K., Prockop, D.J., Cooper, G.W., and Lash, J.W. (1966). Hydroxylation of proline and the intracellular accumulation of a polypeptide precursor of collagen. *Science* 152, 92–94.

Kadler, K.E., Hojima, Y., and Prockop, D.J. (1987). Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen C-proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *J. Biol. Chem.* 262, 15696–15701.

Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., and Boot-Handford, R.P. (2007). Collagens at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 1955–1958.

- Kagan, H.M., and Li, W. (2003). Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell. Biochem.* 88, 660–672.
- Kagan, H.M., and Trackman, P.C. (1991). Properties and Function of Lysyl Oxidase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5, 206–210.
- Käkelä, P., Torpström, J., Venesmaa, S., Ilves, I., Junnila, E.-L., Penttinen, K., Martikainen, T., Gylling, H., Pääkkönen, M., and Pihlajamäki, J. (2013). [Gastric bypass as weight loss operation: 10-year experience of one center and challenges of follow-up]. *Duodecim Lääketieteellinen Aikakauskirja* 129, 756–764.
- Kallunki, P., and Tryggvason, K. (1992). Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 116, 559–571.
- Kamai, Y., Mikawa, S., Endo, K., Sakai, H., and Komano, T. (1996). Regulation of insulin-like growth factor-I expression in mouse preadipocyte Ob1771 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 9883–9886.
- Kamath, V.V., Krishnamurthy, S., Satelur, K.P., and Rajkumar, K. (2015). Transforming growth factor- β 1 and TGF- β 2 act synergistically in the fibrotic pathway in oral submucous fibrosis: An immunohistochemical observation. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol. Off. J. Indian Soc. Med. Paediatr. Oncol.* 36, 111–116.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116, 1494–1505.
- Kao, W.W., Prockop, D.J., and Berg, R.A. (1979). Kinetics for the secretion of nonhelical procollagen by freshly isolated tendon cells. *J. Biol. Chem.* 254, 2234–2243.
- Keay, S., and Grossberg, S.E. (1980). Interferon inhibits the conversion of 3T3-L1 mouse fibroblasts into adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 4099–4103.
- Keophiphath, M., Achard, V., Henegar, C., Rouault, C., Clément, K., and Lacasa, D. (2009). Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 23, 11–24.
- Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., and Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E745–E751.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 1294–1301.

- Kerr, L.D., Miller, D.B., and Matrisian, L.M. (1990). TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61, 267–278.
- Kerwar, S.S., Cardinale, G.J., Kohn, L.D., Spears, C.L., and Stassen, F.L. (1973). Cell-free synthesis of procollagen: L-929 fibroblasts as a cellular model for dermatosparaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1378–1382.
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., and Greenspan, D.S. (1996). Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 271, 360–362.
- Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B.B., Bonaldo, P., Chua, S., and Scherer, P.E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1575–1591.
- Kielty, C.M., Sherratt, M.J., and Shuttleworth, C.A. (2002). Elastic fibres. *J. Cell Sci.* 115, 2817–2828.
- Kim, J.B., and Spiegelman, B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* 10, 1096–1107.
- Kim, S.-H., Turnbull, J., and Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209, 139–151.
- Kimura, N., Toyoshima, T., Kojima, T., and Shimane, M. (1998). Entactin-2: a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen. *Exp. Cell Res.* 241, 36–45.
- Kivirikko, K.I., and Myllylä, R. (1979). Collagen glycosyltransferases. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 8, 23–72.
- Knight, S.C. (2008). Specialized perinodal fat fuels and fashions immunity. *Immunity* 28, 135–138.
- Knott, L., and Bailey, A.J. (1998). Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22, 181–187.
- Knox, S., Merry, C., Stringer, S., Melrose, J., and Whitelock, J. (2002). Not all perlecanins are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 14657–14665.
- Kobayashi, N., Kostka, G., Garbe, J.H.O., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Hanisch, F.-G., Markova, D., Tsuda, T., Timpl, R., Chu, M.-L., et al. (2007). A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *J. Biol. Chem.* 282, 11805–11816.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Göhring, W., and Timpl, R. (1998). Nidogen-2: a new basement

membrane protein with diverse binding properties. *J. Mol. Biol.* 282, 99–109.

Kolditz, C.-I., and Langin, D. (2010). Adipose tissue lipolysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13, 377–381.

Kong, P., Cavalera, M., and Frangogiannis, N.G. (2014). The role of thrombospondin (TSP)-1 in obesity and diabetes. *Adipocyte* 3, 81–84.

Kopelman, P.G. (2005). Clinical treatment of obesity: are drugs and surgery the answer? *Proc. Nutr. Soc.* 64, 65–71.

Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J.F., Lei, J., Zechner, R., and Ferrante, A.W., Jr (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 120, 3466–3479.

Kowluru, R.A., Zhong, Q., and Santos, J.M. (2012). Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin. Investig. Drugs* 21, 797–805.

van Kruijsdijk, R.C.M., van der Wall, E., and Visseren, F.L.J. (2009). Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 18, 2569–2578.

Kumar, C.C. (1998). Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 17, 1365–1373.

Kuo, H.J., Maslen, C.L., Keene, D.R., and Glanville, R.W. (1997). Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 272, 26522–26529.

Kuo, L.E., Kitlinska, J.B., Tilan, J.U., Li, L., Baker, S.B., Johnson, M.D., Lee, E.W., Burnett, M.S., Fricke, S.T., Kvetnansky, R., et al. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat. Med.* 13, 803–811.

Kushner, R.F. (2012). Pharmacologic management of obesity. *Pediatr. Blood Cancer* 58, 140–143.

Kwan, A.P., Cummings, C.E., Chapman, J.A., and Grant, M.E. (1991). Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J. Cell Biol.* 114, 597–604.

Lafontan, M., and Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 276–283.

Lane, T.F., and Sage, E.H. (1990). Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca²⁺-binding sites modulate cell shape. *J. Cell Biol.* 111, 3065–3076.

Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in

Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 3, 309–319.

Layman, D.L., and Ross, R. (1973). The production and secretion of procollagen peptidase by human fibroblasts in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 451–456.

Leahy, D.J., Hendrickson, W.A., Aukhil, I., and Erickson, H.P. (1992). Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* 258, 987–991.

Lee, B., Godfrey, M., Vitale, E., Hori, H., Mattei, M.G., Sarfarazi, M., Tsipouras, P., Ramirez, F., and Hollister, D.W. (1991). Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature* 352, 330–334.

Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., Bae, Y.C., and Jung, J.S. (2004). Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 14, 311–324.

Leitinger, B., and Kwan, A.P.L. (2006). The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 25, 355–364.

Lemeer, S., Bluwstein, A., Wu, Z., Leberfinger, J., Müller, K., Kramer, K., and Kuster, B. (2012). Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1. *J. Proteomics* 75, 3465–3477.

Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.

Leung, D.W. (2001). The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 6, D944–D953.

Li, S., Harrison, D., Carbonetto, S., Fassler, R., Smyth, N., Edgar, D., and Yurchenco, P.D. (2002). Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J. Cell Biol.* 157, 1279–1290.

Li, S., Liquari, P., McKee, K.K., Harrison, D., Patel, R., Lee, S., and Yurchenco, P.D. (2005). Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J. Cell Biol.* 169, 179–189.

Lijnen, H.R., Christiaens, V., Scroyen, I., Voros, G., Tjwa, M., Carmeliet, P., and Collen, D. (2006). Impaired adipose tissue development in mice with inactivation of placental growth factor function. *Diabetes* 55, 2698–2704.

Linsenmayer, T.F., Gibney, E., Igoe, F., Gordon, M.K., Fitch, J.M., Fessler, L.I., and Birk, D.E. (1993). Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 121, 1181–1189.

- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., et al. (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat. Med.* **15**, 940–945.
- Löfgren, P., Andersson, I., Adolfsson, B., Leijonhufvud, B.-M., Hertel, K., Hoffstedt, J., and Arner, P. (2005). Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in the postobese state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6207–6213.
- Lopez, J.I., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2008). Biomechanical regulation of cell orientation and fate. *Oncogene* **27**, 6981–6993.
- Lubrano-Berthelier, C., Cavazos, M., Le Stunff, C., Haas, K., Shapiro, A., Zhang, S., Bougneres, P., and Vaisse, C. (2003). The human MC4R promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes* **52**, 2996–3000.
- Lucero, H.A., and Kagan, H.M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **63**, 2304–2316.
- Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* **56**, 16–23.
- Lumeng, C.N., DelProposto, J.B., Westcott, D.J., and Saltiel, A.R. (2008). Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**, 3239–3246.
- Lynch, L., O’Shea, D., Winter, D.C., Geoghegan, J., Doherty, D.G., and O’Farrelly, C. (2009). Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1893–1901.
- Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O’Shea, D., O’Farrelly, C., and Exley, M.A. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* **37**, 574–587.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 519–531.
- Marconi, S., Bonaconsa, M., Scambi, I., Squintani, G.M., Rui, W., Turano, E., Ungaro, D., D’Agostino, S., Barbieri, F., Angiari, S., et al. (2013). Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model. *Neuroscience* **248C**, 333–343.

- Mariyama, M., Leinonen, A., Mochizuki, T., Tryggvason, K., and Reenders, S.T. (1994). Complete primary structure of the human alpha 3(IV) collagen chain. Coexpression of the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen chains in human tissues. *J. Biol. Chem.* **269**, 23013–23017.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500–1508.
- von der Mark, K. (1981). Localization of collagen types in tissues. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* **9**, 265–324.
- Marneros, A.G., and Olsen, B.R. (2005). Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 716–728.
- Martin, J., Eynstone, L.V., Davies, M., Williams, J.D., and Steadman, R. (2002). The role of ADAM 15 in glomerular mesangial cell migration. *J. Biol. Chem.* **277**, 33683–33689.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 453–461.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791.
- Massagué, J. (2012). TGFβ signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630.
- Massagué, J., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1994). The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* **4**, 172–178.
- Masuno, H., Kidani, T., Sekiya, K., Sakayama, K., Shiosaka, T., Yamamoto, H., and Honda, K. (2002). Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J. Lipid Res.* **43**, 676–684.
- Matsubara, T., Araki, M., Abe, H., Ueda, O., Jishage, K., Mima, A., Goto, C., Tominaga, T., Kinosaki, M., Kishi, S., et al. (2015). Bone Morphogenetic Protein 4 and Smad1 Mediate Extracellular Matrix Production in the Development of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **64**, 2978–2990.
- Mayer, U., Zimmermann, K., Mann, K., Reinhardt, D., Timpl, R., and Nischt, R. (1995). Binding properties and protease stability of recombinant human nidogen. *Eur. J. Biochem. FEBS* **227**, 681–686.
- Mayne, R., and Brewton, R.G. (1993). New members of the collagen superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 883–890.
- Maynes, R. (2012). *Structure and function of Collagen types* (Elsevier).
- McDevitt, C.A., Marcelino, J., and Tucker, L. (1991). Interaction of intact type VI collagen with hyaluronan. *FEBS Lett.* **294**, 167–170.

- McIntosh, K.R., Frazier, T., Rowan, B.G., and Gimble, J.M. (2013). Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *9*, 175–184.
- McKee, K.K., Harrison, D., Capizzi, S., and Yurchenco, P.D. (2007). Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J. Biol. Chem.* *282*, 21437–21447.
- Menezes, M.J., McClenahan, F.K., Leiton, C.V., Aranmolate, A., Shan, X., and Colognato, H. (2014). The Extracellular Matrix Protein Laminin $\alpha 2$ Regulates the Maturation and Function of the Blood–Brain Barrier. *J. Neurosci.* *34*, 15260–15280.
- Mercer, D.K., Nicol, P.F., Kimbembe, C., and Robins, S.P. (2003). Identification, expression, and tissue distribution of the three rat lysyl hydroxylase isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *307*, 803–809.
- Midwood, K.S., Williams, L.V., and Schwarzbauer, J.E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 1031–1037.
- Midwood, K.S., Mao, Y., Hsia, H.C., Valenick, L.V., and Schwarzbauer, J.E. (2006). Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* *11*, 73–78.
- Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G., and Sutherland, A.E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 2247–2256.
- Minoguchi, K., Tazaki, T., Yokoe, T., Minoguchi, H., Watanabe, Y., Yamamoto, M., and Adachi, M. (2004). Elevated production of tumor necrosis factor- α by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* *126*, 1473–1479.
- Miosge, N., Heinemann, S., Leissling, A., Klenczar, C., and Herken, R. (1999). Ultrastructural triple localization of laminin-1, nidogen-1, and collagen type IV helps elucidate basement membrane structure in vivo. *Anat. Rec.* *254*, 382–388.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 56–68.
- Miyazawa-Hoshimoto, S., Takahashi, K., Bujo, H., Hashimoto, N., and Saito, Y. (2003). Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. *Diabetologia* *46*, 1483–1488.
- Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J.-W., Mortensen, P., Otto, T., Nalli, A., Tang, Q.-Q., Lane, M.D., Chaerkady, R., et al. (2009). Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J. Proteome Res.* *8*, 48–58.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* *387*, 903–908.

- Monzon, J.R., Basile, R., Heneghan, S., Udipi, V., and Green, A. (2002). Lipolysis in adipocytes isolated from deep and superficial subcutaneous adipose tissue. *Obes. Res.* 10, 266–269.
- Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N., et al. (2005). Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 12867–12875.
- Motrescu, E.R., and Rio, M.-C. (2008). Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biol. Chem.* 389, 1037–1041.
- Murdoch, A.D., and Iozzo, R.V. (1993). Perlecan: the multidomain heparan sulphate proteoglycan of basement membrane and extracellular matrix. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 423, 237–242.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 8, 929–941.
- Murphy, G., Knäuper, V., Lee, M.-H., Amour, A., Worley, J.R., Hutton, M., Atkinson, S., Rapti, M., and Williamson, R. (2003). Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail. *Biochem. Soc. Symp.* 65–80.
- Murphy-Ullrich, J.E. (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J. Clin. Invest.* 107, 785–790.
- Mussini, E., Hutton, J.J., and Udenfriend, S. (1967). Collagen proline hydroxylase in wound healing, granuloma formation, scurvy, and growth. *Science* 157, 927–929.
- Myers, J.C., Dion, A.S., Abraham, V., and Amenta, P.S. (1996). Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell Tissue Res.* 286, 493–505.
- Myllylä, R., Wang, C., Heikkinen, J., Juffer, A., Lampela, O., Risteli, M., Ruotsalainen, H., Salo, A., and Sipilä, L. (2007). Expanding the lysyl hydroxylase toolbox: new insights into the localization and activities of lysyl hydroxylase 3 (LH3). *J. Cell. Physiol.* 212, 323–329.
- Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., 3rd, Arden, K.C., and Accili, D. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* 4, 119–129.
- Nakagami, H., Maeda, K., Morishita, R., Iguchi, S., Nishikawa, T., Takami, Y., Kikuchi, Y., Saito, Y., Tamai, K., Ogihara, T., et al. (2005). Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2542–2547.
- Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K. (1992). Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 117, 903–914.

- Nakajima, I., Muroya, S., Tanabe, R., and Chikuni, K. (2002). Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *94*, 197–203.
- Nakamura, T., Lozano, P.R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C.-F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., et al. (2002). Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* *415*, 171–175.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *293*, E444–E452.
- Neubauer, K., Krüger, M., Quondamatteo, F., Knittel, T., Saile, B., and Ramadori, G. (1999). Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* *31*, 692–702.
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P.S., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* *480*, 104–108.
- Nie, J., Bradshaw, A.D., Delany, A.M., and Sage, E.H. (2011). Inactivation of SPARC enhances high-fat diet-induced obesity in mice. *Connect. Tissue Res.* *52*, 99–108.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., et al. (2008). In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J. Clin. Invest.* *118*, 710–721.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* *15*, 914–920.
- Nishimura, S., Manabe, I., Takaki, S., Nagasaki, M., Otsu, M., Yamashita, H., Sugita, J., Yoshimura, K., Eto, K., Komuro, I., et al. (2013). Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab.*
- Oakley, S.P., Lassere, M.N., Portek, I., Szomor, Z., Ghosh, P., Kirkham, B.W., Murrell, G. a. C., Wulf, S., and Appleyard, R.C. (2004). Biomechanical, histologic and macroscopic assessment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* *12*, 667–679.
- Ogawa, K., Chen, F., Kuang, C., and Chen, Y. (2004). Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. *Biochem. J.* *381*, 413–422.
- Oh, S.P., Kamagata, Y., Muragaki, Y., Timmons, S., Ooshima, A., and Olsen, B.R. (1994). Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*,

4229–4233.

Ojima, A., Matsui, T., Maeda, S., Takeuchi, M., and Yamagishi, S. (2012). Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) inhibits signaling pathways of advanced glycation end products (AGEs) in endothelial cells via its antioxidative properties. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 44, 501–505.

Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246.

Orend, G., Huang, W., Olayioye, M.A., Hynes, N.E., and Chiquet-Ehrismann, R. (2003). Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene* 22, 3917–3926.

Ortega, N., and Werb, Z. (2002). New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* 115, 4201–4214.

Oshitari, T., Polewski, P., Chadda, M., Li, A.-F., Sato, T., and Roy, S. (2006). Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes-induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes* 55, 86–92.

Ouellet, V., Labbé, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guérin, B., Haman, F., Turcotte, E.E., Richard, D., and Carpentier, A.C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest.* 122, 545–552.

Paiva, T., and Attarian, H. (2014). Obstructive sleep apnea and other sleep-related syndromes. *Handb. Clin. Neurol.* 119, 251–271.

Panigrahy, D., Singer, S., Shen, L.Q., Butterfield, C.E., Freedman, D.A., Chen, E.J., Moses, M.A., Kilroy, S., Duensing, S., Fletcher, C., et al. (2002). PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 110, 923–932.

Pantoja, C., Huff, J.T., and Yamamoto, K.R. (2008). Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol. Biol. Cell* 19, 4032–4041.

Park, J., and Scherer, P.E. (2012). Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *J. Clin. Invest.*

Parry, D.A. (1988). The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys. Chem.* 29, 195–209.

Pellegrinelli, V., Rouault, C., Veyrie, N., Clément, K., and Lacasa, D. (2014a). Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1. *Diabetes* 63, 535–549.

Pellegrinelli, V., Heuvingh, J., du Roure, O., Rouault, C., Devulder, A., Klein, C., Lacasa, M.,

- Clément, E., Lacasa, D., and Clément, K. (2014b). Human adipocyte function is impacted by mechanical cues. *J. Pathol.* **233**, 183–195.
- Peng, H.B., Ali, A.A., Daggett, D.F., Rauvala, H., Hassell, J.R., and Smalheiser, N.R. (1998). The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes. Commun.* **5**, 475–489.
- Penner, A.S., Rock, M.J., Kielty, C.M., and Shipley, J.M. (2002). Microfibril-associated glycoprotein-2 interacts with fibrillin-1 and fibrillin-2 suggesting a role for MAGP-2 in elastic fiber assembly. *J. Biol. Chem.* **277**, 35044–35049.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3710–3714.
- Pfaff, M., Aumailley, M., Specks, U., Knolle, J., Zerwes, H.G., and Timpl, R. (1993). Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Exp. Cell Res.* **206**, 167–176.
- Pfaff, M., Reinhardt, D.P., Sakai, L.Y., and Timpl, R. (1996). Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett.* **384**, 247–250.
- Plaisier, E., Gribouval, O., Alamowitch, S., Mougnot, B., Prost, C., Verpont, M.C., Marro, B., Desmettre, T., Cohen, S.Y., Roullet, E., et al. (2007). COL4A1 mutations and hereditary angiopathy, nephropathy, aneurysms, and muscle cramps. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2687–2695.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. (2000). Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **275**, 21785–21788.
- Pohl, J., Ring, A., Hermann, T., and Stremmel, W. (2004). Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1686**, 1–6.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 1619–1628.
- Prockop, D.J., and Kivirikko, K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 403–434.
- Ra, H.-J., and Parks, W.C. (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **26**, 587–596.
- Ramachandran, G.N. (1988). Stereochemistry of collagen. *Int. J. Pept. Protein Res.* **31**, 1–16.
- Reinboth, B., Hanssen, E., Cleary, E.G., and Gibson, M.A. (2002). Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 3950–3957.

- Reinhardt, D., Mann, K., Nischt, R., Fox, J.W., Chu, M.L., Krieg, T., and Timpl, R. (1993). Mapping of nidogen binding sites for collagen type IV, heparan sulfate proteoglycan, and zinc. *J. Biol. Chem.* 268, 10881–10887.
- Reiser, K., McCormick, R.J., and Rucker, R.B. (1992). Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 2439–2449.
- Ren, D., Collingwood, T.N., Rebar, E.J., Wolffe, A.P., and Camp, H.S. (2002). PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* 16, 27–32.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M., and Hanson, R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 30413–30416.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004978.
- Richardson, A., and Parsons, T. (1996). A mechanism for regulation of the adhesion-associated proteintyrosine kinase pp125FAK. *Nature* 380, 538–540.
- Riedl, E., Pfister, F., Braunagel, M., Brinkkötter, P., Sternik, P., Deinzer, M., Bakker, S.J.L., Henning, R.H., van den Born, J., Krämer, B.K., et al. (2011). Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 28, 279–288.
- Rieusset, J., Touri, F., Michalik, L., Escher, P., Desvergne, B., Niesor, E., and Wahli, W. (2002). A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 16, 2628–2644.
- Risteli, M., Niemitalo, O., Lankinen, H., Juffer, A.H., and Myllylä, R. (2004). Characterization of collagenous peptides bound to lysyl hydroxylase isoforms. *J. Biol. Chem.* 279, 37535–37543.
- Ritty, T.M., Broekelmann, T.J., Werneck, C.C., and Mecham, R.P. (2003). Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. *Biochem. J.* 375, 425–432.
- Roark, E.F., Keene, D.R., Haudenschield, C.C., Godyna, S., Little, C.D., and Argraves, W.S. (1995). The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 43, 401–411.
- Robidoux, J., Martin, T.L., and Collins, S. (2004). Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 297–323.
- Rocha, V.Z., Folco, E.J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A.H., and Libby, P. (2008). Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ. Res.* 103, 467–476.

- RODBELL, M. (1964). METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J. Biol. Chem.* 239, 375–380.
- Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., and Friedman, J.M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240–249.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–617.
- Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16, 22–26.
- Rouault, C., Pellegrinelli, V., Schilch, R., Cotillard, A., Poitou, C., Tordjman, J., Sell, H., Clément, K., and Lacasa, D. (2013). Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* 154, 1069–1079.
- Roy, R., Wewer, U.M., Zurakowski, D., Pories, S.E., and Moses, M.A. (2004). ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J. Biol. Chem.* 279, 51323–51330.
- Roy, S., Sala, R., Cagliero, E., and Lorenzi, M. (1990). Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 404–408.
- Roycik, M.D., Fang, X., and Sang, Q.-X. (2009). A fresh prospect of extracellular matrix hydrolytic enzymes and their substrates. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1295–1308.
- Russo, K., Di Stasio, E., Macchia, G., Rosa, G., Brancaccio, A., and Petrucci, T.C. (2000). Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 93–98.
- Ryden, M., Dicker, A., van Harmelen, V., Hauner, H., Brunnberg, M., Perbeck, L., Lonnqvist, F., and Arner, P. (2002). Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha - mediated lipolysis in human fat cells. *J. Biol. Chem.* 277, 1085–1091.
- Saga, S., Nagata, K., Chen, W.T., and Yamada, K.M. (1987). pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J. Cell Biol.* 105, 517–527.
- Sage, E.H., and Bornstein, P. (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J. Biol. Chem.* 266, 14831–14834.
- Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., et al. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure

and adiposity. *Diabetes* 58, 1526–1531.

Sakai, L.Y., Keene, D.R., and Engvall, E. (1986). Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* 103, 2499–2509.

Sakamoto, H., Broekelmann, T., Cheresch, D.A., Ramirez, F., Rosenbloom, J., and Mecham, R.P. (1996). Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* 271, 4916–4922.

Salans, L.B., Horton, E.S., and Sims, E.A. (1971). Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 50, 1005–1011.

Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., and Nagata, K. (1996). Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell Biol.* 133, 469–483.

Schaefer, L., and Schaefer, R.M. (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 339, 237–246.

Schaffer, J.E., and Lodish, H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427–436.

Schaller, M.D., and Parsons, J.T. (1994). Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 705–710.

Schmidt, C., Fischer, G., Kadner, H., Genersch, E., Kühn, K., and Pöschl, E. (1993). Differential effects of DNA-binding proteins on bidirectional transcription from the common promoter region of human collagen type IV genes COL4A1 and COL4A2. *Biochim. Biophys. Acta* 1174, 1–10.

Schmidt, W., Pöhl-Jordan, G., and Löffler, G. (1990). Adipose conversion of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 265, 15489–15495.

Schönherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J., and Kresse, H. (1995). Interaction of biglycan with type I collagen. *J. Biol. Chem.* 270, 2776–2783.

Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., and Auwerx, J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336–5348.

Schwartz, N.B., and Domowicz, M. (2004). Proteoglycans in brain development. *Glycoconj. J.* 21, 329–341.

Schwarzbauer, J.E. (1991). Fibronectin: from gene to protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 786–791.

- Segal, Y., Zhuang, L., Rondeau, E., Sraer, J.D., and Zhou, J. (2001). Regulation of the paired type IV collagen genes COL4A5 and COL4A6. Role of the proximal promoter region. *J. Biol. Chem.* 276, 11791–11797.
- Sengenès, C., Lolmède, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J. Cell. Physiol.* 205, 114–122.
- Shah, T.J., Leik, C.E., and Walsh, S.W. (2010). Neutrophil infiltration and systemic vascular inflammation in obese women. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 17, 116–124.
- Shamsuzzaman, A.S.M., Winnicki, M., Lanfranchi, P., Wolk, R., Kara, T., Accurso, V., and Somers, V.K. (2002). Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 105, 2462–2464.
- Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J.M., Nugent, M.A., and Iozzo, R.V. (1998). Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* 102, 1599–1608.
- Shoelson, S.E., Herrero, L., and Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169–2180.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G., et al. (1997). An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol. Cell* 1, 25–34.
- Silha, J.V., Krsek, M., Sucharda, P., and Murphy, L.J. (2005). Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int. J. Obes.* 29, 1308–1314.
- Silverman, K.J., Lund, D.P., Zetter, B.R., Lainey, L.L., Shahood, J.A., Freiman, D.G., Folkman, J., and Barger, A.C. (1988). Angiogenic activity of adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 347–352.
- Sjöström, L. (1973). Fatty acid synthesis de novo in adipose tissue from obese subjects on a hypercaloric high-carbohydrate diet. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 32, 339–349.
- Sloane, B.F. (1990). Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 1, 137–152.
- Sloane, B.F., Moin, K., Krepela, E., and Rozhin, J. (1990). Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 333–352.
- Smirnov, S.P., McDearmon, E.L., Li, S., Ervasti, J.M., Tryggvason, K., and Yurchenco, P.D. (2002). Contributions of the LG modules and furin processing to laminin-2 functions. *J. Biol. Chem.* 277, 18928–18937.
- Smith, H.W., and Marshall, C.J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 23–36.

- Smyth, N., Vatansever, H.S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M., and Edgar, D. (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J. Cell Biol.* *144*, 151–160.
- Sotgia, F., Lee, H., Bedford, M.T., Petrucci, T., Sudol, M., and Lisanti, M.P. (2001). Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 14585–14592.
- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* *453*, 783–787.
- Spencer, M., Unal, R., Zhu, B., Rasouli, N., McGehee, R.E., Jr, Peterson, C.A., and Kern, P.A. (2011). Adipose Tissue Extracellular Matrix and Vascular Abnormalities in Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* *87*, 377–389.
- Spiegelman, B.M., and Ginty, C.A. (1983). Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes. *Cell* *35*, 657–666.
- Spiro, M.J., He, Q., and D’Autilia, M.L. (1995). Effect of high glucose on formation of extracellular matrix components by cultured rat heart endothelial cells. *Diabetologia* *38*, 430–436.
- Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Turner, M.S., Mantell, B.S., Stolz, D.B., Sumpter, T.L., Sipula, I.J., Dedousis, N., Scott, D.K., Morel, P.A., et al. (2012). Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes* *61*, 2330–2339.
- Steger, D.J., Grant, G.R., Schupp, M., Tomaru, T., Lefterova, M.I., Schug, J., Manduchi, E., Stoeckert, C.J., and Lazar, M.A. (2010). Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state. *Genes Dev.* *24*, 1035–1044.
- Steinberg, G.R., Michell, B.J., van Denderen, B.J.W., Watt, M.J., Carey, A.L., Fam, B.C., Andrikopoulos, S., Proietto, J., Görgün, C.Z., Carling, D., et al. (2006). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.* *4*, 465–474.
- Strålfors, P., Björgell, P., and Belfrage, P. (1984). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 3317–3321.
- Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A.W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M.P., et al. (2004). Perilipin A mediates the

reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 42062–42071.

Sun, K., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J. Clin. Invest.* 121, 2094–2101.

Szarka, A., and Lőrincz, T. (2014). The role of ascorbate in protein folding. *Protoplasma* 251, 489–497.

Tailleux, A., Wouters, K., and Staels, B. (2012). Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 809–818.

Takahashi, M., Nagaretani, H., Funahashi, T., Nishizawa, H., Maeda, N., Kishida, K., Kuriyama, H., Shimomura, I., Maeda, K., Hotta, K., et al. (2001). The expression of SPARC in adipose tissue and its increased plasma concentration in patients with coronary artery disease. *Obes. Res.* 9, 388–393.

Talts, J.F., Andac, Z., Göhring, W., Brancaccio, A., and Timpl, R. (1999). Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* 18, 863–870.

Talukdar, S., Oh, D.Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., et al. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* 18, 1407–1412.

Tan, C.K., Chong, H.C., Tan, E.H.P., and Tan, N.S. (2012). Getting “Smad” about obesity and diabetes. *Nutr. Diabetes* 2, e29.

Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443.

Tang, K., Nie, D., Cai, Y., and Honn, K.V. (1999). The beta4 integrin subunit rescues A431 cells from apoptosis through a PI3K/Akt kinase signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 127–132.

Tasanen, K., Eble, J.A., Aumailley, M., Schumann, H., Baetge, J., Tu, H., Bruckner, P., and Bruckner-Tuderman, L. (2000). Collagen XVII is destabilized by a glycine substitution mutation in the cell adhesion domain Col15. *J. Biol. Chem.* 275, 3093–3099.

Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* 93, 359–404.

Tenner, A.J. (1999). Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 34–41.

Thomson, C.A., and Ananthanarayanan, V.S. (2000). Structure-function studies on hsp47: pH-dependent inhibition of collagen fibril formation in vitro. *Biochem. J.* 349 Pt 3, 877–883.

- Tiedemann, K., Bätge, B., Müller, P.K., and Reinhardt, D.P. (2001). Interactions of fibrillin-1 with heparin/heparan sulfate, implications for microfibrillar assembly. *J. Biol. Chem.* 276, 36035–36042.
- Tilghman, R.W., and Parsons, J.T. (2008). Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. *Semin. Cancer Biol.* 18, 45–52.
- Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem. FEBS* 180, 487–502.
- Timpl, R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 618–624.
- Timpl, R., and Brown, J.C. (1994). The laminins. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 14, 275–281.
- Timpl, R., and Brown, J.C. (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 18, 123–132.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., and Martin, G.R. (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933–9937.
- To, W.S., and Midwood, K.S. (2011). Identification of novel and distinct binding sites within tenascin-C for soluble and fibrillar fibronectin. *J. Biol. Chem.* 286, 14881–14891.
- Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E.G., and Spiegelman, B.M. (1995). PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 351–357.
- Tordjman, J., Divoux, A., Prifti, E., Poitou, C., Pelloux, V., Hugol, D., Basdevant, A., Bouillot, J.-L., Chevallier, J.-M., Bedossa, P., et al. (2012). Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: relation with liver histopathology in morbid obesity. *J. Hepatol.* 56, 1152–1158.
- Trebaul, A., Chan, E.K., and Midwood, K.S. (2007). Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 695–697.
- Tsiper, M.V., and Yurchenco, P.D. (2002). Laminin assembles into separate basement membrane and fibrillar matrices in Schwann cells. *J. Cell Sci.* 115, 1005–1015.
- Tu, H., Sasaki, T., Snellman, A., Göhring, W., Pirilä, P., Timpl, R., and Pihlajaniemi, T. (2002). The type XIII collagen ectodomain is a 150-nm rod and capable of binding to fibronectin, nidogen-2, perlecan, and heparin. *J. Biol. Chem.* 277, 23092–23099.
- Tucker, R.P., Drabikowski, K., Hess, J.F., Ferralli, J., Chiquet-Ehrismann, R., and Adams, J.C. (2006). Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: evidence of origin early in the chordate lineage. *BMC Evol. Biol.* 6, 60.

- Vaittinen, M., Kolehmainen, M., Schwab, U., Uusitupa, M., and Pulkkinen, L. (2011). Microfibrillar-associated protein 5 is linked with markers of obesity-related extracellular matrix remodeling and inflammation. *Nutr. Diabetes* *1*, e15.
- Varzaneh, F.E., Shillabeer, G., Wong, K.L., and Lau, D.C. (1994). Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism* *43*, 906–912.
- de Vega, S., Iwamoto, T., and Yamada, Y. (2009). Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 1890–1902.
- Vgontzas, A.N., Papanicolaou, D.A., Bixler, E.O., Kales, A., Tyson, K., and Chrousos, G.P. (1997). Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82*, 1313–1316.
- Villaret, A., Galitzky, J., Decaunes, P., Estève, D., Marques, M.-A., Sengenès, C., Chiotasso, P., Tchkonja, T., Lafontan, M., Kirkland, J.L., et al. (2010). Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes* *59*, 2755–2763.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., et al. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1518–1525.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta* *1801*, 338–349.
- Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., and Harris, T.B. (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *282*, 2131–2135.
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F., and Pawson, T. (1997). The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol. Cell* *1*, 13–23.
- Vosselman, M.J., van der Lans, A.A.J.J., Brans, B., Wierds, R., van Baak, M.A., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2012). Systemic β -adrenergic stimulation of thermogenesis is not accompanied by brown adipose tissue activity in humans. *Diabetes* *61*, 3106–3113.
- Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2007). New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *81*, 229–240.
- Wajchenberg, B.L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* *21*, 697–738.
- Walker, G.E., Verti, B., Marzullo, P., Savia, G., Mencarelli, M., Zurleni, F., Liuzzi, A., and Di Blasio, A.M. (2007). Deep subcutaneous adipose tissue: a distinct abdominal adipose depot. *Obes. Silver Spring Md* *15*, 1933–1943.

- Walmsley, A.R., Batten, M.R., Lad, U., and Bulleid, N.J. (1999). Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **274**, 14884–14892.
- Wang, E.A., Israel, D.I., Kelly, S., and Luxenberg, D.P. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors Chur Switz.* **9**, 57–71.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808.
- Welsh, G.I., Hale, L.J., Eremina, V., Jeansson, M., Maezawa, Y., Lennon, R., Pons, D.A., Owen, R.J., Satchell, S.C., Miles, M.J., et al. (2010). Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab.* **12**, 329–340.
- White, E.S., Baralle, F.E., and Muro, A.F. (2008). New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J. Pathol.* **216**, 1–14.
- White, L.A., Mitchell, T.I., and Brinckerhoff, C.E. (2000). Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim. Biophys. Acta* **1490**, 259–268.
- Whittaker, P., Kloner, R.A., Boughner, D.R., and Pickering, J.G. (1994). Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res. Cardiol.* **89**, 397–410.
- Williamson, R.A., Henry, M.D., Daniels, K.J., Hrstka, R.F., Lee, J.C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., and Campbell, K.P. (1997). Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 831–841.
- Wolf, G., Sharma, K., Chen, Y., Ericksen, M., and Ziyadeh, F.N. (1992). High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. *Kidney Int.* **42**, 647–656.
- Wu, Y. (2006). Overweight and obesity in China. *BMJ* **333**, 362–363.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830.
- Yamaguchi, Y., Mann, D.M., and Ruoslahti, E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* **346**, 281–284.
- Yan, Q., Clark, J.I., Wight, T.N., and Sage, E.H. (2002). Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice. *J. Cell Sci.* **115**, 2747–2756.
- Yang, C.W., Vlassara, H., Peten, E.P., He, C.J., Striker, G.E., and Striker, L.J. (1994). Advanced

glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 9436–9440.

Ylikärppä, R., Eklund, L., Sormunen, R., Kontiola, A.I., Utriainen, A., Määttä, M., Fukai, N., Olsen, B.R., and Pihlajaniemi, T. (2003). Lack of type XVIII collagen results in anterior ocular defects. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 2257–2259.

Yogev, Y., and Visser, G.H.A. (2009). Obesity, gestational diabetes and pregnancy outcome. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* *14*, 77–84.

Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* *14*, 163–176.

Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.

Yurchenco, P.D., and Cheng, Y.S. (1993). Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J. Biol. Chem.* *268*, 17286–17299.

Yurchenco, P.D., and O'Rear, J.J. (1994). Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 674–681.

Yurchenco, P.D., and Schittny, J.C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *4*, 1577–1590.

Zacchigna, L., Vecchione, C., Notte, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Cifelli, G., Ferrari, A., Maffei, A., Fabbro, C., et al. (2006). Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell* *124*, 929–942.

Zaferani, A., Talsma, D.T., Yazdani, S., Celie, J.W.A.M., Aikio, M., Heljasvaara, R., Navis, G.J., Pihlajaniemi, T., and van den Born, J. (2014). Basement membrane zone collagens XV and XVIII/proteoglycans mediate leukocyte influx in renal ischemia/reperfusion. *PLoS One* *9*, e106732.

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* *9*, 858–867.

Zaragosi, L.-E., Wdziekonski, B., Villageois, P., Keophiphath, M., Maumus, M., Tchkonja, T., Bourlier, V., Mohsen-Kanson, T., Ladoux, A., Elabd, C., et al. (2010). Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* *59*, 2513–2521.

Zhang, H.H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C., and Greenberg, A.S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* *51*, 2929–2935.

Zhou, J., Ding, M., Zhao, Z., and Reenders, S.T. (1994). Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *J. Biol. Chem.* 269, 13193–13199.

Ziyadeh, F.N. (2004). Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN 15 Suppl 1*, S55–S57.

Ziyadeh, F.N., Sharma, K., Ericksen, M., and Wolf, G. (1994). Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J. Clin. Invest.* 93, 536–542.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.

ANNEXES

Fibrosis as a Cause or a Consequence of White Adipose Tissue Inflammation in Obesity

Sophie Reggio · Vanessa Pellegrinelli · Karine Clément · Joan Tordjman

Published online: 30 December 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract Obesity is defined as an excess accumulation of white adipose tissue associated with a low grade inflammation which is one contributor to obesity complications such as diabetes. Recently, we and others have demonstrated fibrotic depots in white adipose tissue of obese subjects. Fibrosis is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix components which could result in tissue dysfunction. Extracellular matrix is a fibrillar network composed of structural (collagens) and adhesion (fibronectin) proteins crucial for tissue architecture and biological pathway. *Histol Histopathol* 27:1515–1528, 2012. In this review, we aim to describe two hypotheses trying to explain the sequence of events linking fibrosis, inflammation and obesity complications. In the first one, local adipose tissue hypoxia could induce fibrosis accumulation which in turn through adipocyte dysfunction might provoke adipose tissue inflammation. In the

second one, fibrosis could be a result of local adipose tissue inflammation induced by tissue expansion.

Keywords Fibrosis · Inflammation · Hypoxia · Obesity complications · Kinetics · White adipose tissue

Introduction

Obesity is defined as an expansion of white adipose (WAT) tissue that is associated with low grade inflammation which possibly contributes to the development of health complications such as diabetes, liver pathologies, dyslipidemia, cardiovascular diseases as well as some cancers [2–4].

Classically the fat mass expansion results with an increase in the volume (hypertrophy) and the number (hyperplasia) of adipocytes [5, 6]. These morphological changes associate with a myriad of effects including hypoxia, immune cell accumulation [7] and extracellular matrix (ECM) remodeling [8•]. In the past, numerous studies investigating WAT inflammation have shown that the release of pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , IL-6 or gp130 cytokines, are implicated in insulin-resistance [9, 10]. However many more pro and anti-inflammatory mediators produced by the adipose tissue have been described since then. A differential response in the development of obesity complications exists depending on WAT depot distribution. A proinflammatory pattern typically characterizes visceral WAT. Indeed the visceral WAT which is more inflamed with higher accumulation of macrophages [7] has more detrimental effects than the subcutaneous WAT [11]. However, inflammation is not the only factor contributing to WAT dysfunctions; the effects of hypoxia and fibrosis may also play a role in obesity complications via notably ectopic-lipid accumulation in non-adipocyte cells. Indeed, WAT remodeling eventually associated with a limited capacity to adequately expand might induce lipid spill over and this

S. Reggio · V. Pellegrinelli · K. Clément (✉) · J. Tordjman (✉)
INSERM U872, team 7, Nutrimique,
15, rue de l'école de médecine,
75006 Paris, France
e-mail: karine.clement@psl.aphp.fr
e-mail: joan.tordjman@crc.jussieu.fr

S. Reggio
e-mail: sophie.reggio@crc.jussieu.fr

V. Pellegrinelli
e-mail: vanessa.pellegrinelli@crc.jussieu.fr

S. Reggio · V. Pellegrinelli · K. Clément · J. Tordjman
Centre de Recherche des Cordeliers, UMR S 872,
Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Paris 75006, France

S. Reggio · V. Pellegrinelli · K. Clément · J. Tordjman
Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris 75006, France

K. Clément · J. Tordjman
Institut Cardiometabolisme et Nutrition (ICAN) Pitié Salpêtrière
Hospital, Paris 75013, France

triglyceride accumulation in other depots such as liver or muscle. However, lipid accumulation in non-specialized cells is deleterious and can contribute to cell death resulting in the development of pathology such as NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis) a liver injury associated with obesity [12].

In this review, we aim to describe the relationships and discussed sequence of events associated with hypoxia, ECM remodeling and inflammation in the development of obesity and associated complications. Whether fibrosis is a cause or consequence of inflammation is presently unknown but will be discussed further.

Extracellular Matrix Remodeling and Fibrosis

The extracellular matrix is essential for the architecture of the tissue and a myriad of associated biological functions. This fibrillar network is composed of many structural proteins, such as collagens, and adhesion proteins, including fibronectin and proteoglycans (perlecan, decorin) [13, 14]. Collagens are crucial for the ECM architecture and particularly collagen I, III and VI are key components in animal tissues. ECM components (i.e., fibronectin or collagens) directly interact with membrane receptors (i.e., integrins), particularly, by influencing cell behavior. Integrins are directly linked to the cytoskeleton. Thus any modification of ECM components can be transmitted via integrins and impact on cell movement during development and proliferation, differentiation, apoptosis.

ECM also modulates the bioavailability of many growth factors. For example proteoglycans sequester biomolecules such as growth factors (TGF- β , VEGF, FGF etc.) and MMPs (Matrix Metalloproteinases). MMPs are proteolytic enzymes highly specialized in the degradation of ECM component [15, 16] and each member of the MMP family is specifically involved in degradation of one or several ECM components. These enzymes are crucial to maintain ECM structure but also for the release of active molecules with various biological functions [16]. For example, the cleavage of collagen XVIII by MMP-9 releases the endostatin fragment [17] which has the ability to inhibit the formation of new blood vessels [18–20]. Scherrer et al. have also revealed that endotrophin, a collagen VI fragment, is implicated in fibrosis, inflammation and angiogenesis [21]. MMPs can also activate growth factors sequestered in the ECM. For example, inactive pro-TGF- β interacts with fibronectin [22] and thrombospondin [23]. In the context of ECM remodeling, MMP-9 cleaves pro-TGF- β which is rapidly released and activated [24]. The activated form of TGF- β has been shown to be implicated in fibrogenesis [25] by promoting the synthesis of collagen I.

In pathological processes, several organs can be the site of fibrosis accumulation such as the liver, heart, and kidney

[26]. Fibrosis is indeed defined as an excessive accumulation of ECM components which is a result of degradation impairment and an excess synthesis of fibrillar components including collagen I, III and VI. The repair process is fundamental for the replacement of dead or injured cells in response to inflammation. This process starts during the regenerative phase where cells are replaced by others. However, if the damage persists, then myofibroblasts are activated and secrete collagens and fibrillar components, in order to replace the normal parenchymal tissue. As a result, fibrotic depots accumulate in tissues.

Thus, while tissue remodeling and fibrosis appearance is initially a physiological and beneficial process for the tissue; fibrosis accumulation sometimes associates with the absence of resolution of inflammation which can be can highly deleterious to organ biological function and homeostasis with time.

WAT and Extracellular Matrix

As all mammalian tissue, WAT is the site of a dynamic remodeling of the elements of the extracellular matrix. This fibrillar network composed of structural protein as collagen I, III and VI and adhesion protein (fibronectin) might play a crucial role in the physiology but also in the pathophysiology of the WAT.

In Physiological Conditions

WAT has a unique plasticity illustrated by its capacity to rapidly expand or to diminish in size to ensure proper systemic energy homeostasis. The first data on the WAT ECM was reported by Napolitano, in 1963, using Transmission Electron Microscopy. Napolitano examined the WAT development in rats and highlighted the presence of fibrillar collagen networks surrounding adipocytes [27]. The ECM can be remodeled in both physiological and pathological conditions. For example, a notable ECM remodeling for WAT function occurs during adipocyte differentiation. Indeed during the differentiation of adipose cell progenitors into mature adipocytes, the collagen I/fibronectin-rich matrix surrounding pre-adipocytes is progressively replaced by a basement membrane mainly composed of collagen IV, laminin, nidogen and perlecan. This remodeling is crucial for the conversion of fibroblast-like cell into an adipocyte, a spherical cell which store triglycerides in the lipid droplets influencing cell size. Thus, culturing 3T3-L1 preadipocytes on a fibronectin-rich matrix strongly inhibits adipocyte differentiation [28]. Conversely, human preadipocytes cultured on a matrigel (mainly composed of basement membrane components) or laminin (the main basement membrane component) display enhanced adipose differentiation [29].

At the tissue level, a human study performed in healthy and growing children, has shown the importance of collagen accumulation and described a strong negative correlation between the abundance of collagen deposition and adipocyte size [30]. Taken together, these studies emphasize the crucial role of ECM in adipose tissue physiology and development.

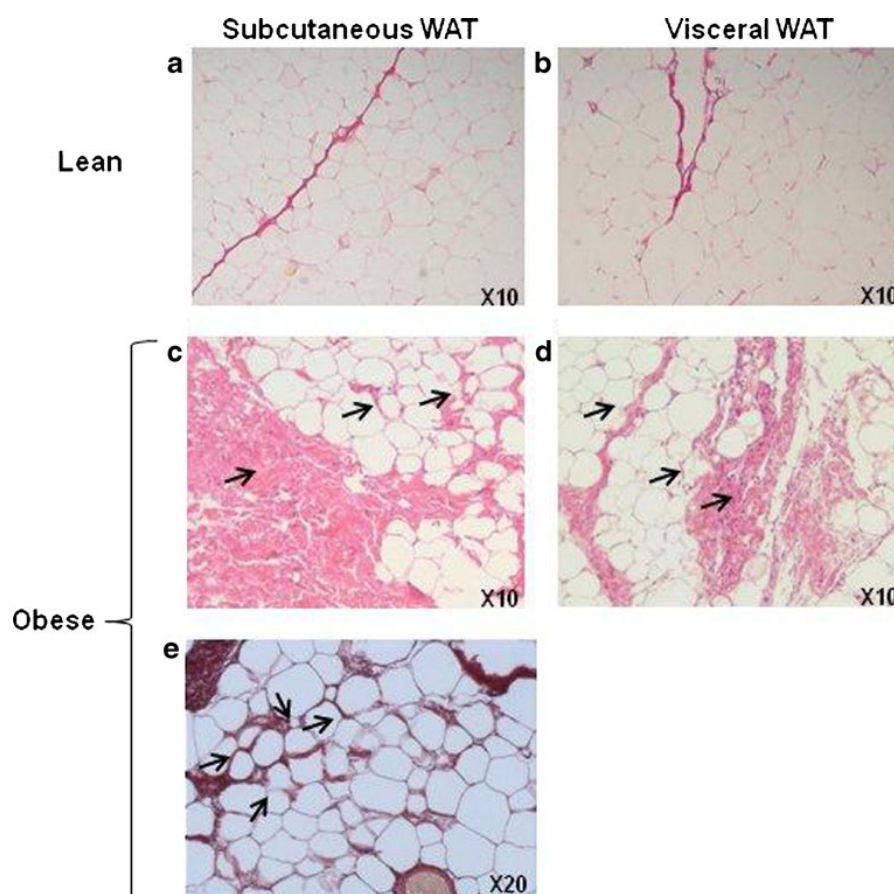
In Pathological Conditions

Impairment in ECM organization and composition can lead to important WAT dysfunctions. A chronic positive energy balance promoting obesity development induces WAT modifications with adipocyte hypertrophy and hyperplasia, accumulation of inflammatory cells and neovascularization [31]. These morphological modifications lead to ECM remodeling with degradation of the existing ECM and the production of new ECM components. WAT remodeling has been shown in mice consuming a high fat diet for 20 weeks [32]. Strissel et al. have observed an acute collagen deposition associated with an increase of inflammatory markers and the concomitant accumulation of macrophages in WAT.

The examination of the transcriptomic signature of obese WAT has highlighted for the first time the over-expression of many ECM components in obese compared to lean WAT [33, 34]. ECM gene networks were tidily limited with inflammatory gene networks in this set of experiments. Based on the evidence of major expression changes in ECM components, our team has measured the abundance of collagen depots in obese subjects compared to lean ones [8•]. The red picosirius staining quantification, specific for fibrillar collagens, showed higher collagen deposition in both obese scWAT and visceral WAT compared to lean adipose tissues (Fig. 1). Periadipocyte accumulation of collagens was particularly characteristic of obesity. Our team has also characterized the collagen deposition and observed an increase in the deposition of collagen I, III and VI in obese individuals.

While accumulation of collagen appears as an important feature in obese WAT, the precise origin of fibrosis accumulation is scarcely understood. Preadipocytes are considered as candidate cells that may play a crucial role in WAT remodeling. Indeed cultures of human preadipocytes with pro-inflammatory macrophages media induces an over-expression and secretion

Fig. 1 Adipose tissue fibrosis in obesity. Red picosirius staining of **a** subcutaneous white adipose tissue (WAT) and **b** visceral WAT of lean subjects compared to **c**, **e** subcutaneous WAT and **d** visceral WAT of obese subjects. *Black arrows* = collagen depots



of several collagen types [35]. However, other cell types may also play a role in the accumulation of WAT fibrosis. For example, endothelial cells as epithelial cells can be converted into myofibroblasts via a process named endothelial-mesenchymal transition in many tissues [36]. This specific process has not been described in the adipose tissue. Pericytes, the mural cells of blood vessels, provide structural and nutritional support to endothelial cells and also participate to tissue fibrogenesis. In a pathological context, pericytes can detach from the vessel walls, migrate and acquire a fibroblast-like morphology to secrete collagens. This phenomenon has been described in several fibrotic diseases such as in liver [37] and kidney injuries [38] as well as systemic sclerosis [39]. In human WAT, pericytes are poorly characterized but new evidence demonstrated their activation with increased expression of collagen I and TGF β (V. Pellegrinelli, personal data). Furthermore, endothelial cells in obese visceral WAT subjects were reported to be senescent [40] inducing vascular wall remodeling as a pericyte detachment which could be converted in fibroblast-like cell.

Fibrocytes, a population of fibroblast-like cells present in blood, could also contribute to the growth and maintenance of adipose tissue [41] and their lineage commitment is regulated by TGF- β . Furthermore, it has been shown that fibrocytes participate in wound healing after injury [42]. Thus, during obesity, fibrocytes could invade adipose tissue and actively participate in WAT fibrosis.

Finally, adipocytes could also contribute to the production of fibrosis based on our recent observations showing the presence of peri-cellular fibrosis surrounding adipocytes [8•], which can be due to an increased synthesis or low degradation of ECM components by the adipocytes. However, cellular actors implicated in WAT fibrosis are poorly defined and more studies are warranted for their characterization. Fibrosis seems implicated in WAT dysfunction and obesity complications. Bioinformatics analysis of WAT transcriptome has demonstrated a strong positive correlation between BMI, WAT inflammation and ECM components [33]. Furthermore, ob/ob mice lacking collagen VI in WAT have significant improvements in their glucose metabolism which is associated with the absence of fibrotic depots and inflammation [43•]. This result highlights the implication of WAT fibrosis in insulin-resistance which has been supported by another study performed in human subjects in which collagen VI expression strongly correlated with glucose metabolism impairment [44•]. Overall, these studies suggest that obesity, WAT inflammation and fibrosis can sometimes be closely related events but the sequences of the events remains to be determined. On the other hand, data reported that overfeeding in healthy men for 2 months leads to collagen deposition and neovascularization in scWAT, with no changes in immune cell accumulation and inflammation suggesting that inflammation and collagen accumulation might not be always linked [45].

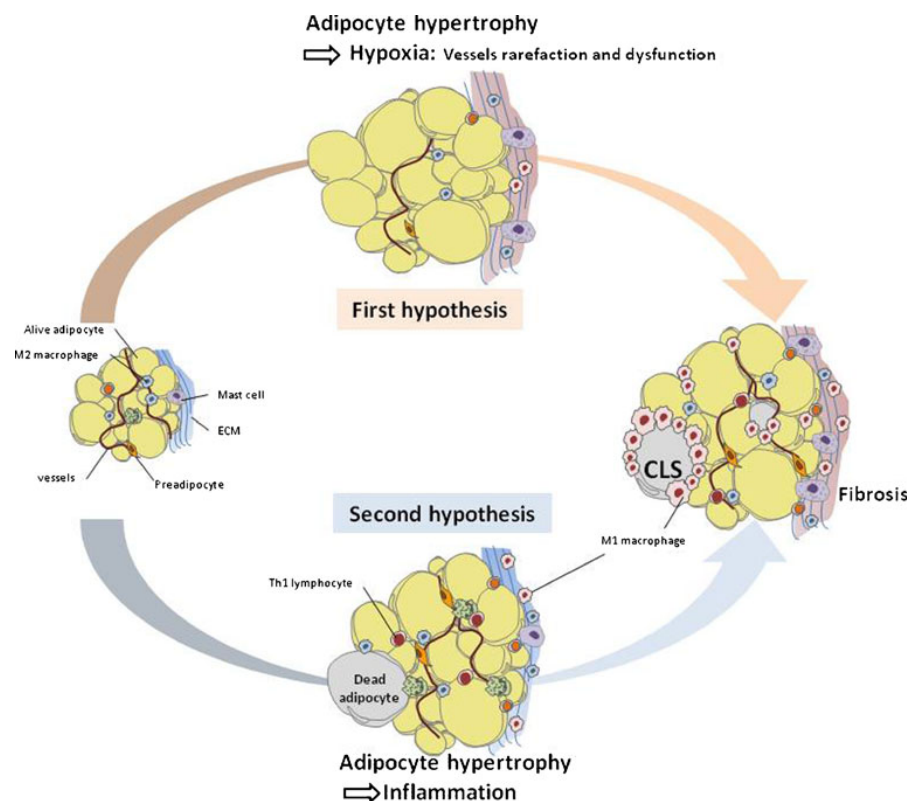
The First Hypothesis: Fibrosis as a Cause of WAT Inflammation

The first hypothesis proposes fibrosis as an early event in obesity and related metabolic disorders such as insulin resistance and a cause of WAT inflammation. This hypothesis is related to experimental data mostly in animal models linking the appearance of adipose tissue hypoxia and the promotion of fibrosis. In such conditions, hypoxia and fibrosis could lead to an adipocyte dysfunction which in turn might induce inflammation as detailed below (Fig. 2).

Indeed in order to provide oxygen and nutrients to adipocytes, the WAT vascularization is highly developed and each adipocyte is in close contact with capillaries [46]. A very functional vascular network is thus critical for adipose tissue homeostasis. The expansion of WAT in obesity should be accompanied by a proportional increase in the vascularization, in order to provide adequate supply in oxygen and nutrients to the tissue. However, several studies have suggested abnormal oxygen supply in obese WAT for example by measuring the Adipose Tissue Blood Flow (ATBF) or the AT oxygen partial pressure. Using radioactive xenon, a first report in 1966 has demonstrated a reduction in the radioisotope clearance in obese scWAT [47]. Several studies performed in animal models and in humans have confirmed this result. For example, ATBF is reduced in Sprague-Dawley rats using radio-labeled microsphere [48]. More recently, a study using polarographic electrode to measure the subcutaneous tension oxygen has shown that obese scWAT was hypoxic [49]. However, while hypoxia could be associated with obesity development, it does not necessarily associate with insulin-resistance. In a recent study, ATBF was reduced only in obese diabetic Zucker rats and not in non-obese diabetic Goto-Kakizaki rats. However, in another study in humans, the ATBF reduction correlates with the insulin-sensitivity state of the subjects [50, 51].

Molecular regulators of hypoxia are better understood. The HIF1 proteins regulate the response to oxygen availability at the transcriptional level [52]. HIF1 is also tightly regulated at the protein levels. During hypoxia, HIF1 protein is stabilized and can regulate its main target genes which are pro-angiogenic genes such as VEGF A and angiopoietin-2. It has been proposed in several conditions such as metabolic syndrome and diabetes that HIF pathway could be dysregulated [53]. As such the gene expression of HIF1 α is up-regulated in scWAT of obese subjects [54]. Immunodetection of HIF1 α in ob/ob mice adipose tissue has showed that adipocytes are the cells predominantly expressing HIF1 α in WAT [55]. Thus disturbances in HIF1 signaling seem to play a detrimental role in adipocyte function [56•, 57, 58]. Importantly, KO mice targeted for HIF1 α adipocytes are protected from the consequence of HFD [57, 58]. Adipocytes secrete angiogenic factors, such as leptin,

Fig. 2 Fibrosis as a cause or consequence of WAT inflammation. This first hypothesis proposes that during weight gain, hypoxia enhances adipose tissue fibrosis that could lead to an adipocyte dysfunction which in turn might induce inflammation. The second hypothesis proposes fibrosis as a late event in obesity development and as a consequence of low-grade inflammation



adiponectin, angiopoietin-2 and VEGF A [46], which expression is stimulated by HIF1. HFD fed mice overexpressing VEGF A in WAT have also an increase of vessel density and display an improvement of their glucose and lipid metabolism [59]. Overall, these observations suggest a determinant role of oxygen supply as well as the involvement of HIF-related molecular mechanisms in WAT homeostatic function. Furthermore it has been shown that local hypoxia and HIF dysregulation could contribute to fibrosis. In addition to pro-angiogenic genes, the over-expression of HIF1 in mouse WAT induces a significant up regulation of many pro-fibrotic genes such as collagen I, III, VI, CTGF (connective tissue growth factor) and LOX (Lysyl Oxydase) associated with fibrosis appearance. LOX is an enzyme crucial for collagen cross-linking and its overexpression has been shown to be associated in several organs fibrosis [60–62] and regulated by hypoxia [63]. These mice overexpressing HIF1 α showed impairment in glucose metabolism [56]. LOX seemed to be a crucial component for the formation of WAT fibrosis because the pharmacological inhibition of LOX activity in mice overexpressing HIF1 was associated with a reduction in size of the collagen-laden streaks in scWAT. In such condition glucose metabolism was improved.

The increase in LOX activity induces a collagen cross-linking and thus tissue stiffening. This rigid fibrotic deposition

surrounding adipocytes could create hypoxic pockets and increase mechanical stress by expanding adipocytes and leading to necrosis. In such condition, adipocyte deaths create a local inflammation that results in the accumulation of inflammatory cells dedicated initially to remove cellular debris. This phenomenon occurs in chronic inflammation and could self-perpetuate and contribute to the development of insulin resistance.

However, others studies have shown that HIF1 α can also activate some inflammatory genes such as the transcription factor NF κ B [64] and thus hypoxia could directly induce WAT inflammation without fibrosis. During obesity, the importance of adipocyte necrosis has not been elucidated and the measure of adipocyte turnover. Indeed, analyses of the integration of 14C derived from nuclear bomb tests in genomic DNA of WAT [65], have not shown any modification in the adipocyte death or generation rate in obese WAT. As a result, the time-course of events seem to be more complicated than expected, especially in the natural progression of obesity in humans.

The Second Hypothesis: Fibrosis as a Consequence of WAT Inflammation

This hypothesis proposes fibrosis as a late event in obesity development and as a consequence of low-grade inflammation

(Fig. 2). WAT is a crucial endocrine organ which can secrete many adipocytokines such as leptin, [CC] Chemokines Ligand 2 (CCL-2), IL-6 (Interleukine-6) and adiponectin which are implicated in physiological and pathological processes [66–68]. Obesity is classically associated with chronic and low-grade inflammatory status characterized by immune cell accumulation such as macrophages [7], mast cells [69], neutrophils [70] and T lymphocytes [71] which may relate to the development of obesity-induced insulin-resistance [2, 66]. It has been shown that macrophage accumulation precedes or is associated with the development of insulin-resistance in obese animals [72, 73]. The invalidation of genes involved in macrophage recruitment (CCR2 CC Chemokine receptor 2, the CCL2 receptor), inflammatory cytokine production (TNF α), and pro-inflammatory transcriptional activation (NF κ B) in several mouse models have revealed a protective effect to a high-fat diet inducing insulin-resistance [72, 74]. Macrophages can exist in different activation states with distinct properties [75] (*i.e.*, pro-inflammatory M1 macrophages and anti-inflammatory M2 macrophages). M1 macrophages are crucial for the initial steps of the immune response in order to eliminate pathogens. Conversely, M2 macrophages appear to be important for the final step of the immune response to replace the injured tissue by connective tissue through secretion of pro-fibrotic molecules such as TGF- β or MMP9. Numerous studies have tried to phenotype adipose tissue macrophages (ATMs). However the characterization of the precise phenotype of ATMs remains challenging due to the lack of specific markers for each class of macrophages. Histological analysis have revealed the presence of M1 macrophages in structure named “crown-like structure” surrounding necrotic adipocytes in human and mice [76]. Another study has highlighted the presence of M2 macrophages in the interstitial space between adipocytes in WAT mice [77]. In human WAT, the characterization is more complex and a mixed M1/M2 phenotype has been demonstrated [78] and notably in fibrotic depots [8•]. The presence in WAT of macrophages, mast cells and T lymphocytes participate to reinforce the WAT inflammatory state by secreting cytokines such as TNF α , IFN γ and IL-6; T-lymphocytes are also involved in the development of fibrosis by releasing TGF- β and MMP9. Interestingly, mast cells particularly accumulate in fibrotic WAT depots [69] in humans, but their precise role in the promotion or degradation of fibrosis in human WAT is unknown.

Activin A, is a TGF- β family protein that has pro-fibrotic proprieties [25]. Smad 2 and 3 mediate the pathway of the TGF- β family by binding to the collagen I promoter [79]. Furthermore, neutrophils [80] and macrophages [81] are known to secrete MMP9 which have been shown crucial for the activation of the TGF- β family member [24]. In obese subjects, MMP9 and Activin A have been shown to be over-expressed in WAT [82, 83] and have increased systemic levels [84] (M. Keophiphath,

unpublished data). Furthermore, our team has recently shown an activin A over-expression in inflammatory pre-adipocytes [85] which then can act on cells via the Smads pathway by inducing collagen expressions.

In this hypothesis, inflammation is due to the accumulation of immune cells as an early event in obesity development. The secretion by immune cells of pro-fibrotic factors such as activin A and MMP9 are both crucial for ECM remodeling leading to fibrosis.

Recently, using a time-course microarray study during a diet-induced obesity in mice, Kwon et al. have revealed that inflammatory related-genes are over-expressed in visceral WAT prior to genes being selected for fibrosis formation [86]. This result seems to validate the hypothesis that fibrosis is a late event in obesity development and influenced by local adipose tissue inflammation.

Conclusion

There is a close relationship between WAT inflammation and fibrosis [2] with accumulating evidence indicating that WAT dysfunction contributes to obesity associated complications [87, 88]. However, the time-course of the events is not yet fully established. Different studies have generated two main hypotheses. The first hypothesis proposes that local adipose tissue hypoxia induces fibrosis promoting adipocyte necrosis in order to renew the cells. Subsequently, in order to remove cellular debris, immune cells, such as macrophages and T lymphocytes, are recruited and induce a low-grade inflammation which can self-perpetuate over time. The second hypothesis proposes that adipose tissue expansion produces immune cell accumulation which elicits a low-grade inflammation. Fibrosis is defined as a process induced in the context of an unresolved chronic inflammation [26]. Therefore, the accumulation of immune cells, by secreting pro-fibrotic molecules, which induces the activation of fibrosis-producing cells and also the removal of dead cells, could participate in fibrosis accumulation.

One of the hypotheses concerning the link between obesity and type 2 diabetes proposes that insulin-resistance is induced by pro-inflammatory cytokines such as TNF α and IL-6 [89]. However, Vidal-Puig and Virtue have proposed a new theory, “the adipose tissue expendability”, based on the concept that subcutaneous WAT has a limited capacity to expand [90]. When WAT storage is exceeded mechanical limitations such as ECM remodeling could occur. Thus, in this hypothesis, WAT fibrosis limits adipose tissue expansion, thereby; excess lipids cannot store anymore and are directed to ectopic sites such as liver and muscle. Then in these tissues, lipids exert toxic effects and induce insulin-resistance. Currently, this theory has not yet been fully confirmed but supportive evidence is in line with the “adipose tissue expendability theory”.

Mice deleted for collagen VI, one of the main collagen implicated in WAT fibrosis, on an ob/ob background have more fat mass but develop less insulin-resistance [43•]. Furthermore, a human study has revealed a positive correlation between collagen VI expression in scWAT and glucose metabolism impairment [44•].

Finally, the sequence of events such as WAT hypoxia, inflammation and fibrosis leading to obesity complications are poorly understood and more kinetic studies on obesity development, notably in humans such as that performed in [86], are necessary to understand the development of obesity complications.

Acknowledgment We are grateful to colleagues at U872 team 7 particularly for helpful discussions. We thank Assistance Publique/Hôpitaux de Paris (APHP), National Research Agency (ANR Adipofib, PHRC fibrota, IHU), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), and the corporate Echossens, which support our studies on WAT fibrosis. J. Tordjman and K. Clément equally contributed to this manuscript.

Disclosure No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance
- Of major importance

1. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Frühbeck G. Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology. Relevance in the development of obesity. *Histol Histopathol*. 2012;27:1515–28.
2. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860–7.
3. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004;92:347–55.
4. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011;121:2111–7.
5. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:885–96.
6. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*. 2007;48:1253–62.
7. Cancelli R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55:1554–61.
8. •• Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 2010;59:2817–25. *This study highlights fibrosis in the WAT of obese subject and notably some fibrillar collagen such as the type I, III and VI.*
9. Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341:507–14.
10. Marcos-Gómez B, Bustos M, Prieto J, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Obesity, inflammation and insulin resistance: role of gp 130 receptor ligands. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31:113–23.
11. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev*. 1994;74:761–811.
12. Ibrahim SH, Kohli R, Gores GJ. Mechanisms of lipotoxicity in NAFLD and clinical implications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;53:131–40.
13. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326:1216–9.
14. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a004903.
15. Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res*. 2012. doi:10.1007/s00441-012-1410-z.
16. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463–516.
17. Nilsson UW, Dabrosin C. Estradiol and tamoxifen regulate endostatin generation via matrix metalloproteinase activity in breast cancer in vivo. *Cancer Res*. 2006;66:4789–94.
18. Marnaros AG, Keene DR, Hansen U, Fukai N, Moulton K, Goletz PL, et al. Collagen XVIII/endostatin is essential for vision and retinal pigment epithelial function. *EMBO J*. 2004;23:89–99.
19. Marnaros AG, Olsen BR. Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J*. 2005;19:716–28.
20. Zatterstrom UK, Felbor U, Fukai N, Olsen BR. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2000;25:97–101.
21. Park J, Scherer PE. Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *J Clin Invest*. 2012. doi:10.1172/JCI63930.
22. Mooradian DL, Lucas RC, Weatherbee JA, Furcht LT. Transforming growth factor-beta 1 binds to immobilized fibronectin. *J Cell Biochem*. 1989;41:189–200.
23. Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol*. 1993;122:923–32.
24. Yan J-D, Yang S, Zhang J, Zhu T-H. BMP6 reverses TGF-beta1-induced changes in HK-2 cells: implications for the treatment of renal fibrosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30:994–1000.
25. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-β signaling in fibrosis. *Growth Factors*. 2011;29:196–202.
26. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007;117:524–9.
27. Napolitano L. The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *J Cell Biol*. 1963;18:663–79.
28. Spiegelman BM, Ginty CA. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes. *Cell*. 1983;35:657–66.
29. O'Connor KC, Song H, Rosenzweig N, Jansen DA. Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose. *Biotechnol Lett*. 2003;25:1967–72.
30. Tam CS, Tordjman J, Divoux A, Baur LA, Clément K. Adipose tissue remodeling in children: the link between collagen deposition and age-related adipocyte growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:1320–7.
31. Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J*. 2009;276:5738–46.
32. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield 2nd JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56:2910–8.

33. Mutch DM, Tordjman J, Pelloux V, Hanczar B, Henegar C, Poitou C, et al. Needle and surgical biopsy techniques differentially affect adipose tissue gene expression profiles. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:51–7.
34. Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol*. 2008;9:R14.
35. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*. 2007;148:868–77.
36. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer*. 2008;99:1375–9.
37. Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*. 2002;50:71–81.
38. Lin S-L, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*. 2008;173:1617–27.
39. Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ, Rubin K, Black CM. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:930–41.
40. Villaret A, Galitzky J, Decaunes P, Estève D, Marques M-A, Sengenès C, et al. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes*. 2010;59:2755–63.
41. Hong KM, Burdick MD, Phillips RJ, Heber D, Strieter RM. Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice. *FASEB J*. 2005;19:2029–31.
42. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994;1:71–81.
43. • Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol*. 2009;29:1575–91. *This study demonstrates in a mouse model the crucial role of collagen VI in WAT fibrosis and metabolism disorders.*
44. • Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:5155–62. *This study shows the strong correlation between WAT fibrosis characterized by collagen VI expression and insulin-resistance in humans.*
45. Alligier M, Meugnier E, Debard C, Lambert-Porcheron S, Chanseaneume E, Sother M, et al. Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:E183–92.
46. Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:107–15.
47. Larsen OA, Lassen NA, Quaade F. Blood flow through human adipose tissue determined with radioactive xenon. *Acta Physiol Scand*. 1966;66:337–45.
48. Crandall DL, Goldstein BM, Huggins F, Cervoni P. Adipocyte blood flow: influence of age, anatomic location, and dietary manipulation. *Am J Physiol*. 1984;247:R46–51.
49. Kabon B, Nagele A, Reddy D, Eagon C, Fleshman JW, Sessler DI, et al. Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology*. 2004;100:274–80.
50. Jansson PA, Larsson A, Lönnroth PN. Relationship between blood pressure, metabolic variables and blood flow in obese subjects with or without non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 1998;28:813–8.
51. Karpe F, Fielding BA, Ilic V, Macdonald IA, Summers LKM, Frayn KN. Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. *Diabetes*. 2002;51:2467–73.
52. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci*. 2007;32:389–97.
53. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*. 2001;7:345–50.
54. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54:2277–86.
55. Higami Y, Barger JL, Page GP, Allison DB, Smith SR, Prolla TA, et al. Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. *J Nutr*. 2006;136:343–52.
56. • Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol*. 2009;29:4467–83. *This study shows in mice models the implication of HIF1, the hypoxic transcription factor, WAT fibrogenesis in the context of obesity.*
57. Jiang C, Qu A, Matsubara T, Chanturiya T, Jou W, Gavrilova O, et al. Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes*. 2011;60:2484–95.
58. Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, et al. Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes Dev*. 2012;26:259–70.
59. Sun K, Wernstedt Asterholm I, Kusminski CM, Bueno AC, Wang ZV, Pollard JW, et al. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:5874–9.
60. Decitre M, Gleyzal C, Raccurt M, Peyrol S, Aubert-Foucher E, Csiszar K, et al. Lysyl oxidase-like protein localizes to sites of de novo fibrinogenesis in fibrosis and in the early stromal reaction of ductal breast carcinomas. *Lab Invest*. 1998;78:143–51.
61. López B, González A, Hermida N, Valencia F, de Teresa E, Díez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1–9.
62. Szauter KM, Cao T, Boyd CD, Csiszar K. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. *Pathol Biol*. 2005;53:448–56.
63. Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res*. 2006;66:10238–41.
64. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336:1066–71.
65. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453:783–7.
66. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005;96:939–49.
67. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K. Adiponectin and adiponectin receptors in obesity-linked insulin resistance. *Novartis Found Symp*. 2007;286:164–76. discussion 176–182;200–203.
68. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;892:146–54.
69. Divoux A, Moutel S, Poitou C, Lacasa D, Veyrie N, Aissat A, et al. Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity,

- inflammatory status, and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E1677–85.
70. Shah TJ, Leik CE, Walsh SW. Neutrophil infiltration and systemic vascular inflammation in obese women. *Reprod Sci.* 2010;17:116–24.
 71. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation.* 2007;115:1029–38.
 72. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006;116:115–24.
 73. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821–30.
 74. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li Z-W, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2005;11:191–8.
 75. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453–61.
 76. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005;46:2347–55.
 77. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes.* 2008;57:3239–46.
 78. Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G, et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond).* 2007;31:1420–8.
 79. Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *J Invest Dermatol.* 1999;112:49–57.
 80. Tracy Jr TF. Editorial: Acute pancreatitis and neutrophil gelatinase MMP9: don't get me started! *J Leukoc Biol.* 2012;91:682–4.
 81. Dreier R, Grässel S, Fuchs S, Schaumburger J, Bruckner P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res.* 2004;297:303–12.
 82. Tinahones FJ, Coín-Aragüez L, Mayas MD, Garcia-Fuentes E, Hurtado-Del-Pozo C, Vendrell J, et al. Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels. *BMC Physiol.* 2012;12:4.
 83. Zaragosi L-E, Wdziekonski B, Villageois P, Keophiphath M, Maumus M, Tchkonja T, et al. Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes.* 2010;59:2513–21.
 84. Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, et al. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation.* 2008;117:806–15.
 85. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clément K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol.* 2009;23:11–24.
 86. Kwon E-Y, Shin S-K, Cho Y-Y, Jung UJ, Kim E, Park T, et al. Time-course microarrays reveal early activation of the immune transcriptome and adipokine dysregulation leads to fibrosis in visceral adipose depots during diet-induced obesity. *BMC Genom.* 2012;13:450.
 87. Schram K, Sweeney G. Implications of myocardial matrix remodeling by adipokines in obesity-related heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:199–205.
 88. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediat Inflamm.* 2009;2009:831670.
 89. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007;132:2169–80.
 90. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:338–49.

Hedi Soussi,^{1,2,3} Sophie Reggio,^{1,2,3} Rohia Alili,^{1,2,3} Cecilia Prado,² Sonia Mutel,^{1,2,3} Maria Pini,^{1,2,3} Christine Rouault,^{1,2,3} Karine Clément,^{1,2,3} and Isabelle Dugail^{1,2,3}



DAPK2 Downregulation Associates With Attenuated Adipocyte Autophagic Clearance in Human Obesity



Diabetes 2015;64:3452–3463 | DOI: 10.2337/db14-1933

Adipose tissue dysfunction in obesity has been linked to low-grade inflammation causing insulin resistance. Transcriptomic studies have identified death-associated protein kinase 2 (DAPK2) among the most strongly downregulated adipose tissue genes in human obesity, but the role of this kinase is unknown. We show that mature adipocytes rather than the stromal vascular cells in adipose tissue mainly expressed DAPK2 and that DAPK2 mRNA in obese patients gradually recovered after bariatric surgery-induced weight loss. DAPK2 mRNA is also downregulated in high-fat diet-induced obese mice. Adenoviral-mediated DAPK2 overexpression in 3T3-L1 adipocytes did not affect lipid droplet size or cell viability but did increase autophagic clearance in nutrient-rich conditions, dependent on protein kinase activity. Conversely, DAPK2 inhibition in human preadipocytes by small interfering RNA decreased LC3-II accumulation rates with lysosome inhibitors. This led us to assess autophagic clearance in adipocytes freshly isolated from subcutaneous adipose tissue of obese patients. Severe reduction in autophagic flux was observed in obese adipocytes compared with control adipocytes, inversely correlated to fat cell lipids. After bariatric surgery, adipocyte autophagic clearance partially recovered proportional to the extent of fat cell size reduction. This study links adipocyte expression of an autophagy-regulating kinase, lysosome-mediated clearance and fat cell lipid accumulation; it demonstrates obesity-related attenuated autophagy in adipocytes, and identifies DAPK2 dependence in this regulation.

Adipose tissue function includes the deposition of nutrient-derived energy excess as lipids and the integration of energy

balance signals to produce leptin and adiponectin required for metabolic homeostasis. Chronic energy balance disruption as seen in obesity leads to adipose tissue lipid overload and adaptive stress responses toward ultimate dysfunction and metabolic inflexibility (1). Large-scale transcriptomic studies of adipose tissue from obese patients or obese rodent models pointed to inflammatory pathways as a prominent response to lipid overload (2–4). Inflammation in obesity results from tissue remodeling by immune cell infiltration/proliferation within the adipose fat depot (5). Indeed, whereas the adipocyte is the predominant cell type in healthy lean adipose tissue, immune cells can equal or even exceed fat cell number in obesity. Metabolic inflammation is now recognized as a key factor in obesity-related insulin resistance and the subject of current investigations of immune cell subpopulations (6) toward novel therapeutic approaches.

Besides identification of expression networks and associated biological functions, transcriptomic approaches also bring attention to single genes unrelated to annotated pathways. In the current study, we focus on death-associated protein kinase 2 (DAPK2), also called DRP-1, which hits among the most downregulated genes of the adipose tissue transcriptome in human morbid obesity (7). DAPK2 belongs to a family of serine/threonine calmodulin-regulated protein kinases that consists of five members, all displaying high sequence homology in their N-terminal kinase domains, whereas COOH-terminal regions highly diverge. DAPK1, the founding family member, is involved in apoptosis (8) and is suppressed in many tumors (9). Unlike DAPK1, DAPK2 and other DAPKs are devoid of a COOH-terminal death domain, ankyrin repeats, and

¹Nutriomics Team, INSERM, UMR_S U1166, Paris, France

²Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, UMR_S 1166, Paris, France

³Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Corresponding author: Isabelle Dugail, isabelle.dugail@inserm.fr.

Received 23 December 2014 and accepted 21 May 2015.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db14-1933/-/DC1>.

© 2015 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered.

cytoskeleton-interacting region (9). Therefore, DAPK2 is a small protein that only contains a kinase domain, a calmodulin binding region, and a short tail with undefined structural motifs. DAPK2 is ubiquitously expressed, but its physiological functions are still largely unknown. Interestingly, large-scale RNA interference kinome screens identified DAPK2, suggesting a role in autophagy (10), secretory pathway (11), or transforming growth factor- β signaling by protein-to-protein interaction (12).

In the current study, we investigated the significance of DAPK2 downregulation in human obesity. We first identified adipocytes and not other nonlipid filled adipose tissue cells as targets of DAPK2 downregulation. Then, the effects of DAPK2 gain/loss of function in cultured adipose cells revealed a regulatory role of the kinase in lysosome-mediated remodeling, which led us to further investigate adipocyte autophagic clearance in human obesity and weight loss. We demonstrated attenuation of adipocyte autophagic activity in human obesity, partially reversible after weight loss after bariatric surgery. Thus, these results link DAPK2 downregulation and defective autophagy to fat cell dysfunction in human obesity.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Human Adipose Tissue Samples

All subjects gave their informed consent in an accepted protocol related to the physiopathology of obesity (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Clinical Research Contract). Clinical investigations were performed according to the Declaration of Helsinki and approved by local ethics committees. Middle-aged obese subjects who were candidates for bariatric surgery were not on a restrictive diet and their weights were reported stable. All subjects met usual eligibility criteria for bariatric surgery. Follow-up of patients after gastric bypass included monitoring of weight loss and obtaining subcutaneous adipose tissue biopsy specimens from the abdominal region. All tissue samples were processed immediately for adipocyte isolation or frozen for mRNA extraction.

Control subjects were nonobese subjects undergoing plastic surgery or planned surgery for gall bladder ablation or hernia. None had diabetes or metabolic disorders or were taking medication. Main characteristics of the patient groups are summarized in Table 1.

Adipocyte Isolation

Floating adipocytes were obtained by collagenase digestion essentially as described by Rodbell (13), except that DMEM was used instead of Krebs-Ringer buffer. Floating adipocytes were separated from the stromal vascular fraction (SVF) cells by aspirating the infranatant and rinsing three times with DMEM. Minor contamination of the adipocyte fraction by stromal vascular cells was checked on morphological images of adipocyte suspensions used for fat cell size determination.

Cell Culture

3T3-L1 cells were maintained and differentiated in standard conditions. Adenovirus was obtained by recombination

of viral backbones with shuttle vectors containing DAPK2 cDNAs and packaging in complementing 293 cells, as described previously (14). GFP-LC3 3T3-L1 stable transfectants were obtained as described (15). Human preadipocytes were isolated from subcutaneous adipose tissue and cultured as described (16). Small interfering (si)RNA-mediated knockdown was performed with 20 nmol/L siRNAs using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. DAPK2 siRNA sequence was from Abgent (5'-UGUCU GGAGGAGAGCUCUUTTAAGAGCUCUCCUCCAGACATT-3'). Scrambled siRNAs were used as controls. Fresh medium supplemented with antibiotics and 10% SVF was added 16 h after transfection, and cells were incubated for a further 24 h.

Mice Studies

Male *ob/ob* and *ob/+* mice were maintained on a normal chow diet with ad libitum feeding and killed at 12–16 weeks of age (body weights 30.1 ± 3.1 vs. 58.2 ± 3.4 g). C57BL/6J male mice were fed a high-fat diet (60% calories from fat) for 16 weeks from weaning onward and killed (body weights 37.9 ± 1.8 vs. 48.2 ± 3.5 g).

mRNA Quantification

mRNAs were reversed transcribed and cDNA were quantified by real-time RT-PCR using qPCR MasterMix Plus for SYBR Green (Eurogentec). The PCR efficiency of primer pairs was checked in standard curves, and expression data were expressed using the $\Delta\Delta C_t$ method. 18S RNA was used for normalization. The sequence of primer pairs for DAPKs was as follows:

Human DAPK2: 5'-ACGTGGTGCTCATCCTTGA-3' and 5'-TGGCCTCCTCCTCACTCA-3'.

Mouse DAPK2: 5'-GACGTGGTGCTCATCCTTG-3' and 5'-GGCTTCCTCCTCACTTAACGA-3'.

Mouse DAPK1: 5'-CCTGATTTCAGGACAAGG-3' and 5'-CTTTAGCCACGGAGTAATCAGCC-3'.

Mouse DAPK3: 5'-ATTGTGACGGAGGTTCTCG-3' and 5'-TCTGAAGGATTCTGGGGACA-3'.

A complete list of the other primer sequences is provided in the Supplementary Data.

Autophagic Flux Measurement

Experimental design followed state of the art guidelines (17). Freshly isolated floating adipocytes or differentiated cells lines were rinsed with high-glucose DMEM and incubated for 2 h in the presence of 100 nmol/L bafilomycin A1, 100 μ mol/L leupeptin/20 mmol/L NH_4Cl , or 25 μ mol/L chloroquine at 37°C in a humidified 95% air/5% CO_2 atmosphere. Cells were collected in lysis buffer (50 mmol/L Tris [pH 7.4], 0.27 mol/L sucrose, 1 mmol/L Na-orthovanadate, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Na β -glycerophosphate, 50 mmol/L NaF, 5 mmol/L Na pyrophosphate, 1% [w/v] Triton X-100, and 0.1% [v/v] 2-mercapto ethanol) supplemented with Complete protease inhibitors and stored frozen at -20°C before further processing.

Table 1—Description of patients

	Lean (<i>n</i> = 22)	Overweight (<i>n</i> = 10)	Obese (<i>n</i> = 65)	Obese (for surgery follow-up) (<i>n</i> = 9)
Sex, <i>n</i>				
Female	20	4	38	9
Male	2	6	27	0
BMI (kg/m ²)	23.6 ± 3.2	26.35 ± 0.19	47.56 ± 0.04	42.55 ± 3.14
Age (years)	38 ± 11	43 ± 2	47 ± 0.05	33 ± 8
Subcutaneous fat cell diameter (μm)	87.4 ± 12	—	121.16 ± 0.04	119.9 ± 3.8

Data are presented as mean ± SEM unless indicated otherwise.

Western Blotting

Cell lysates were processed as previously described (18). Commercial antibodies against LC3, Akt, and β-actin were from Cell Signaling Technology, DAPK2 from ProSci, and p62 from Progen.

Lipolysis

Lipolytic rates were assessed in cells maintained for 2 h in phenol-red free medium containing 2% BSA with or without 10^{−5} mol/L isoproterenol for lipolytic stimulation. Glycerol release was measured using a glycerol colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) and normalized to cell protein content.

Cell Imaging

3T3-L1 stable transfectants expressing GFP-LC3 were differentiated and processed for fluorescent imaging as previously described (19). Intracellular lipid droplets and floating adipocytes were sized using Perfect Image (Clara Vision) from phase-contrast images. Immunofluorescence on paraffin-embedded adipose tissue sections was performed as described (20).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The Mann-Whitney *U* test was used in all analyses except for paired data, which were tested with the Wilcoxon signed rank test or the paired Student *t* test. The Spearman rank correlation test was used for correlations.

RESULTS

Downregulation of Adipocyte DAPK2 Expression in Human Obesity

Our attention on DAPK2 was brought by pangenomic transcriptome analysis comparing adipose tissue gene expression in lean and obese subjects (7). We confirmed a threefold decrease in DAPK2 mRNA (Fig. 1A) in subcutaneous adipose tissue samples from 65 severely obese (BMI range 34–79 kg/m²) compared with 10 nonobese subjects (BMI range 20–23 kg/m²), not influenced by type 2 diabetes (Fig. 1B) or by sex (not shown). Low DAPK2 mRNA expression was also independently confirmed in a subgroup of 24 severely obese compared with 10 overweight (BMI 24–28 kg/m²) subjects (Fig. 1C), pointing to DAPK2 downregulation as a feature of severe obesity but not of simple overweight. Relative DAPK2 mRNA levels in obese subjects

positively correlated with HDL cholesterol and inversely associated with triglyceridemia and serum interleukin 6 (IL-6). A trend for negative association to subcutaneous fat cell size (*P* = 0.057) was also observed (Table 2).

Because bariatric surgery (i.e., gastric bypass) is the most efficient intervention to induce weight loss in morbid obesity, we examined DAPK2 mRNA in 10 patients over time at 0, 3, 6, and 12 months after surgery. Gradual time-dependent recovery, almost complete after 12 months (Fig. 1D), indicated that DAPK2 loss was not irreversible in obese adipose tissue. We also found decreased DAPK2 mRNA in the subcutaneous adipose tissue of mice with diet-induced obesity, indicating common obesity-related DAPK2 regulation in humans and rodents (Fig. 1E). Adipose tissue digestion by collagenase was performed to determine relative DAPK2 mRNA expression in the isolated adipocyte and the nonlipid-filled stromal vascular cell compartment of human fat tissue. In nonobese as well as in obese subjects, DAPK2 mRNA was more abundant in adipocytes than in stromal vascular cells (Fig. 1F), and a major reduction with obesity was found in the adipocyte fraction (Fig. 1F). Thus, adipocyte-enriched DAPK2 expression is suppressed in human obesity and reversibly recovers after bariatric surgery-induced weight loss in humans. Immunofluorescence labeling of adipose tissue sections confirmed adipocyte DAPK2 suppression in obese patients at the protein level (Fig. 1G).

DAPK2 Modulates Lysosome-Mediated Remodeling and Constitutive Autophagy in Adipocytes

The bulk of human fat cells are renewed every 10 years, consistent with function in long-term energy storage, and the adipocyte is considered a long-lived cell type (21). In this context, the conserved process of intracellular organelle remodeling by lysosomes (i.e., autophagy) is crucial to maintain homeostasis (22), especially in oxidatively prone conditions linked to a lipid-rich adipocyte environment. Because DAPK2 was suggested as a potential autophagy regulator (10,23,24), we focused on constitutive autophagy in the presence of nutrients. We generated 3T3-L1 adipocytes stably expressing GFP-LC3, which retained full differentiation capabilities, as judged by the presence of large multilocular cytoplasmic lipid droplets. Fluorescent GFP-LC3 distribution identified autophagosome vesicles, visualized as punctuated labeled structures (Fig. 2A) and

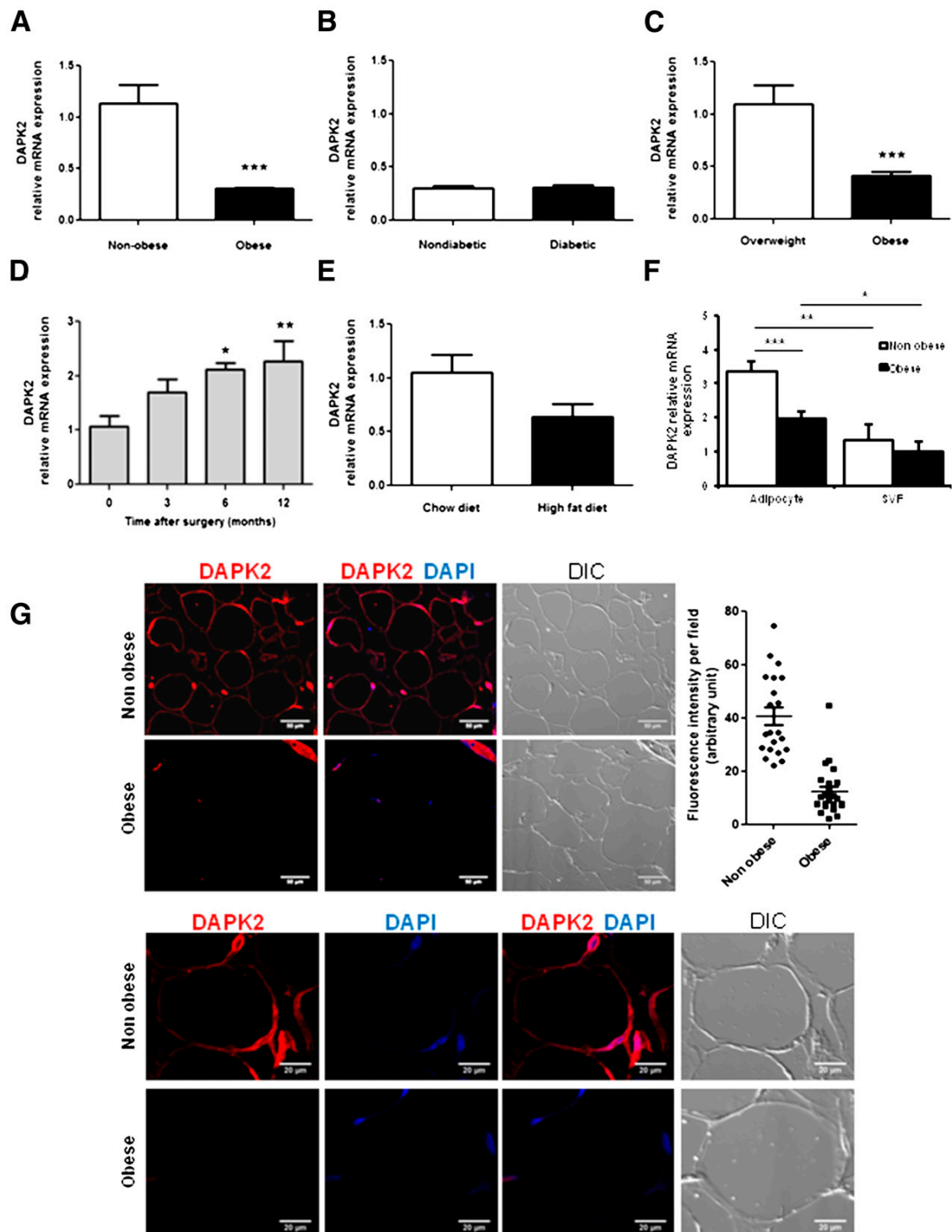


Figure 1—Downregulation of adipocyte DAPK2 expression in obesity. **A:** DAPK2 mRNA (relative to 18S) was quantified by RT-PCR in subcutaneous adipose tissue of 10 nonobese healthy subjects (mean BMI 23 kg/m²) and 65 massively obese patients (BMI range 34–79 kg/m²). **B:** Stratification of the obese group for diabetes (33 subjects among 65). **C:** DAPK2 mRNA in a subgroup of subjects with overweight ($n = 10$, BMI range 25–28 kg/m²) or with massive obesity ($n = 24$). **D:** Time course of DAPK2 mRNA recovery after obesity treatment by gastric bypass surgery. Nine patients undergoing surgery were followed up over time, and adipose tissue specimens were collected. Significant changes before vs. after surgery were assessed by the Wilcoxon signed rank test. **E:** DAPK2 mRNA expression in inguinal adipose tissue of mice fed a control chow diet or high-fat diet for 16 weeks. Bars are mean \pm SEM values from five individual mice.

Table 2—Association of adipose tissue DAPK2 mRNA expression with clinical parameters in obese patients

	Spearman coefficient	P value
Presurgery evaluation		
Triglyceridemia	−0.36216	0.0056
Serum IL-6	−0.28225	0.0448
Subcutaneous fat cell surface	−0.24069	0.0574
HDL cholesterol	0.35756	0.0063
12-month postsurgery evaluation		
Glycemia	−0.69007	0.0397

also detectable as LC3-II fast-migrating bands on Western blots (Fig. 2B), which accumulated in the presence of lysosomal inhibitors such as chloroquine, leupeptin/ NH_4Cl , or bafilomycin A1, indicating ongoing autophagic clearance. As expected, nutrient withdrawal from culture medium increased autophagy flux (Fig. 2C) in agreement with well-known induction of autophagy by cell starvation. In some cell types, such as hepatocytes (25) or macrophages (26), intracellular lipid droplet organelles can end up in lysosomes for lipid degradation through so-called lipophagy. Lipophagy is poorly documented in fat cells, but the importance of activation of cytoplasmic neutral lipases for lipid droplet degradation is clearly established (27). We observed no increase in autophagic flux during acute lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes with the β -adrenergic agonist isoproterenol (Fig. 2D), and lysosomal inhibitors only marginally affected lipid mobilization as judged by cell glycerol release into the medium (Fig. 2E). Thus, autophagic clearance and lipid store mobilization by catecholamines are distinct processes in adipocytes.

DAPK2 mRNA expression in terminally differentiated 3T3-L1 adipocytes was two orders of magnitude lower than the two other related DAPKs (Fig. 3A), pointing to the 3T3-L1 model as a suitable system to explore the effect of exogenous DAPK2. Adenoviral (Ad)-based expression of DAPK2 (Ad-DAPK2) or a kinase-dead mutant version (Ad-DAPK2-K52A), coexpressed with an EGFP reporter, indicated a high proportion of transduced fat cells after 24 h (not shown). Compared with cells transduced with a null virus, DAPK2 expression did not produce overt metabolic effects. Cells continued to respond to acute insulin stimulation by massive Akt phosphorylation (Fig. 3B) and still contained lipid droplets with normal size distribution (Fig. 3C). Metabolic (leptin, adiponectin, fatty acid synthase, or perilipin 1) and inflammatory (IL-6, chemokine [C-C motif] ligand-2) gene expression was also

unaltered (Fig. 3D). Furthermore, we observed no sign of cell leakage by cytoplasmic lactate dehydrogenase release (Fig. 3E), indicating unaffected cell viability. Considering a trend (+20%) toward increased ability to release glycerol upon adrenergic lipolytic stimulation (Fig. 3F), DAPK2-expressing adipocytes showed no evidence for dysfunction or death. Adipocyte clearance by autophagy (i.e., autophagic flux), as measured by LC3-II accumulation in the presence of lysosomal inhibitors, was higher in cells expressing DAPK2 than in cells transduced with viral backbone alone (Fig. 3G). Furthermore, DAPK2-mediated stimulation of autophagic clearance was abolished with a kinase-dead mutant version, indicating dependence on kinase activity for autophagy modulation (Fig. 3H).

We next evaluated the effect of DAPK2 inhibition by siRNA in human preadipocytes obtained from adipose tissue SVF. siRNA sequences decreased DAPK2 protein by half (Fig. 4A), increased cell contents of the p62 autophagic substrate (Fig. 4B), and decreased autophagosome accumulation with lysosome inhibitors, indicating reduced autophagic flux (Fig. 4C). All together, these data on gain or loss of function demonstrate that modulation of DAPK2 expression in adipose cells associates with basal autophagic tone regulation.

Adipocyte Autophagic Clearance Is Impaired in Obesity and Partially Reversed After Weight Loss

The above results suggest that downregulated adipocyte DAPK2 might be linked to attenuation of autophagic clearance in obesity. We therefore prepared isolated adipocyte cell fractions from obese and lean subcutaneous fat biopsy specimens and evaluated steady-state levels of the autophagic substrate p62, which were elevated two-fold in obese versus lean adipocytes (Fig. 5A and B), indicative of lower autophagic degradation. Nevertheless, p62 mRNA was also higher in adipocytes from obese subjects compared with control subjects (Fig. 5C), precluding any definite conclusion on autophagic flux based on p62 protein content. We next set up an experiment in which freshly isolated adipocytes were incubated in a standard nutrient-rich medium, in the presence or absence of lysosome inhibitors, to evaluate rates of autophagosome accumulation (i.e., adipocyte autophagic flux). LC3-II accumulation in the presence of lysosome inhibitors was obvious in nonobese adipocytes but was only barely detected in obese fat cells (Fig. 5D). Quantitative analysis of LC3-II accumulation rates demonstrated reduced adipocyte autophagic clearance in obesity (Fig. 5E). Furthermore,

F: Floating adipocyte fraction was separated from the SVF by collagenase digestion of adipose tissue specimens obtained from 9 lean and 10 obese subjects. DAPK2 expression (relative to 18S) was determined in paired cell fractions by quantitative RT-PCR. Statistically significant differences between groups are indicated. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. G: DAPK2 immunolabeling of subcutaneous adipose tissue sections. DAPK2 fluorescence intensity was quantified using ImageJ software, and background values obtained by omitting primary antibody were subtracted. A total of 50 adipose tissue fields from three lean and three obese donors were quantified. DIC, differential interference contrast.

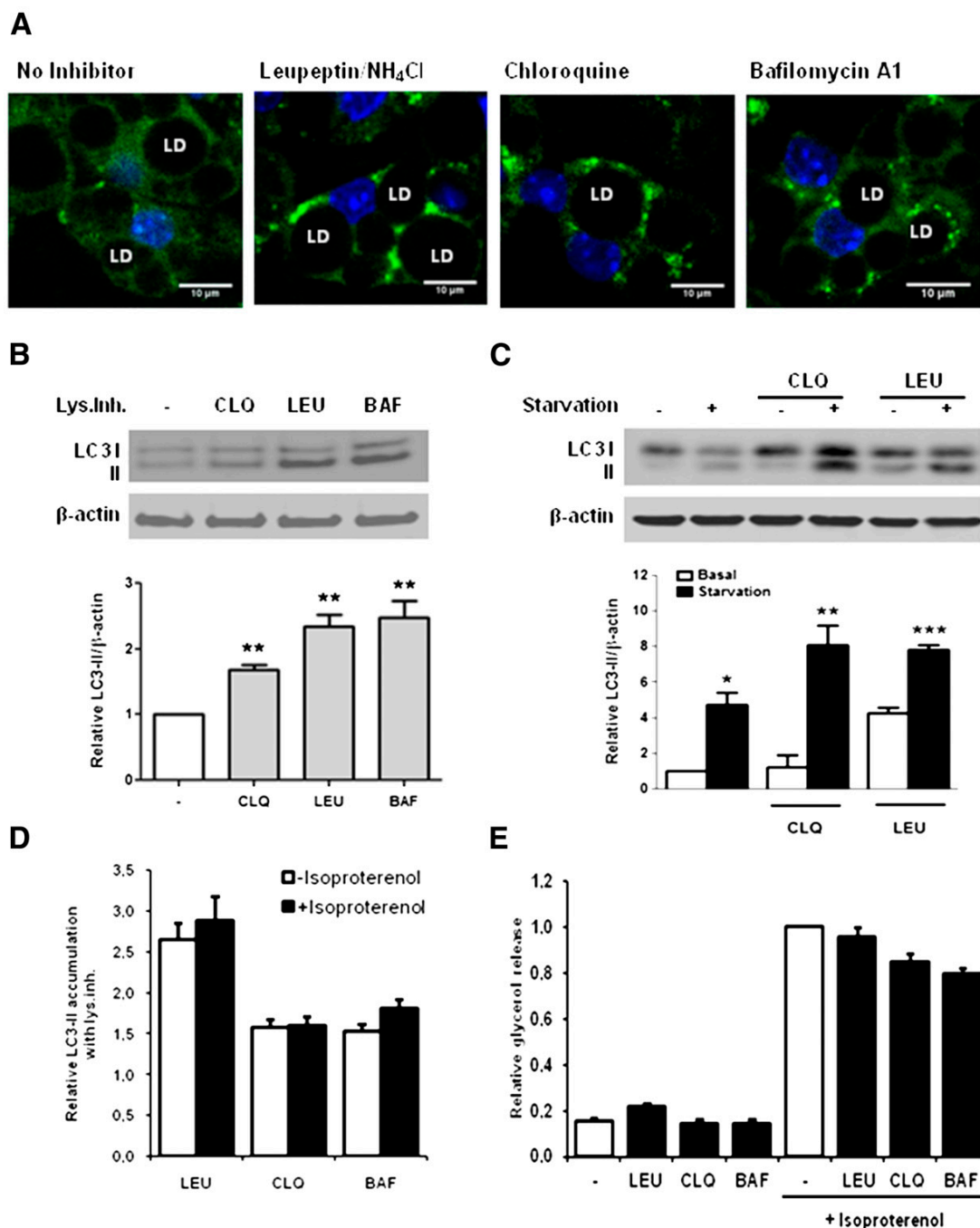


Figure 2—Constitutive lysosome-mediated autophagy in cultured adipocytes. **A:** Terminally differentiated 3T3-L1 stably expressing GFP-LC3. Growing 3T3-L1 cells were transfected with a retroviral pBabe construct expressing GFP-LC3, and stably expressing cells were selected with puromycin. Differentiation was induced under standard conditions. Terminally differentiated cells (day 12) were left untreated (basal) or incubated for 2 h with indicated lysosome inhibitors chloroquine (CLO), leupeptin/NH₄Cl (LEU), or bafilomycin A1 (BAF) in serum-containing medium. Confocal fluorescent images are shown after fixation and DAPI staining of nuclei. Circular black areas in cells are lipid droplets (LD). **B:** Terminally differentiated 3T3-L1 were treated or not with lysosomal inhibitors (Lys.Inh.) as in **A** and lysed for LC3 analysis by Western blotting. Bars represent inhibitor-induced accumulation of LC3-II/actin relative to medium with no inhibitor. Values are mean \pm SEM from 10 independent experiments. **C:** 3T3-L1 adipocytes were incubated for 1 h with Hanks' Balanced Salt Solution (starvation) or complete medium. **D** and **E:** 3T3-L1 adipocytes lipolytic stimulation by isoproterenol (10^5 mol/L, 2 h) in the presence of lysosomal inhibitors. Values are mean \pm SEM in six experiments. **D:** LC3-II accumulation as in **C**. **E:** Glycerol release into the medium was expressed as nmol/mg cell protein. Values obtained in isoproterenol-stimulated cells with no inhibitor were set to 1. Asterisks indicate statistical significance for *P* values: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, or ****P* < 0.001.

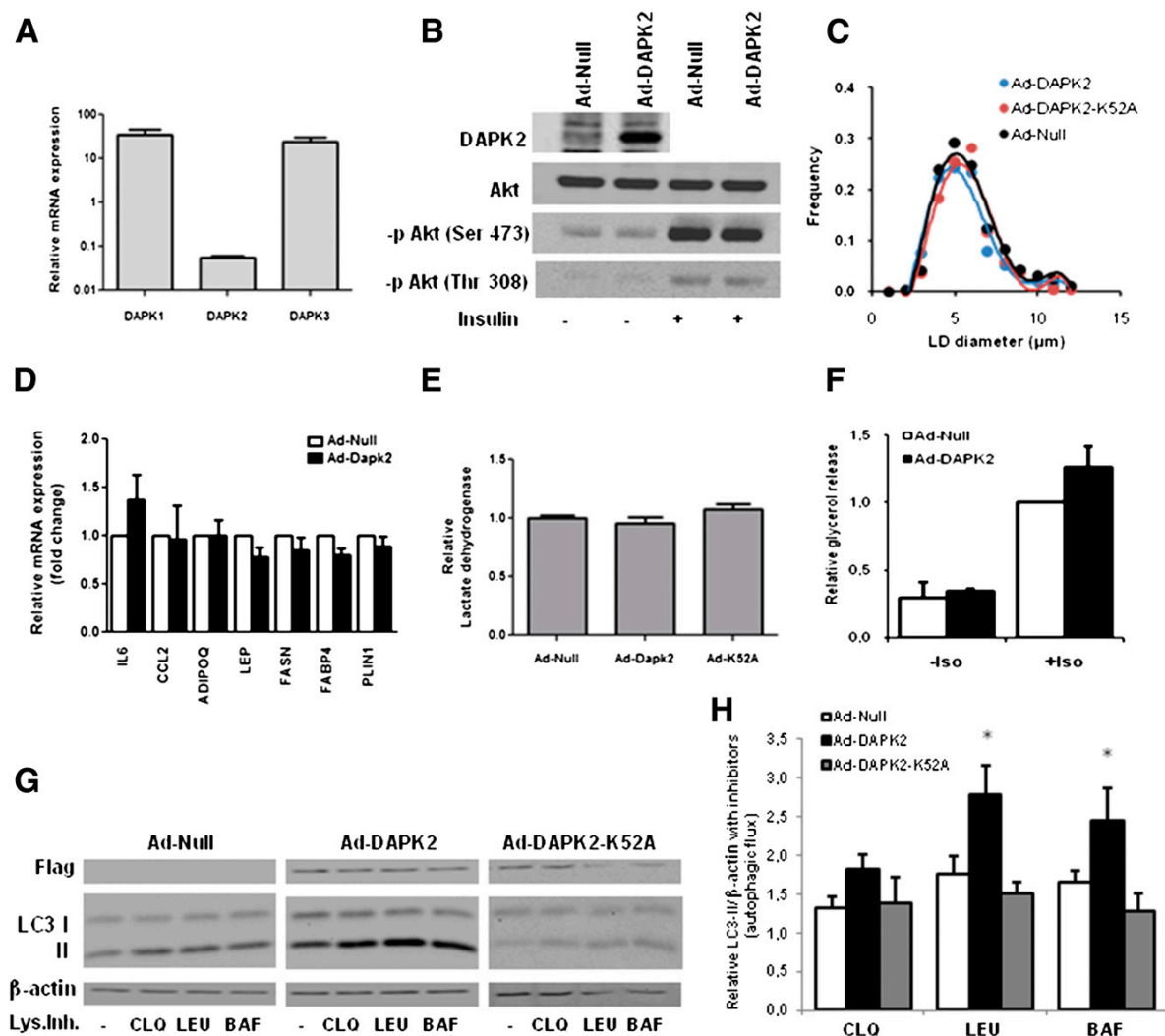


Figure 3—DAPK2 exogenous expression increases adipocyte autophagic clearance in 3T3-L1. **A**: Relative expression of the three DAPKs in terminally differentiated 3T3-L1 adipocytes. Expression is normalized to 18S RNA. At least three independent mRNA preparations were used for quantification. **B**: Insulin response in Ad-DAPK2-expressing 3T3-L1 cells. Terminally differentiated cells were transduced with indicated adenoviruses and left in standard medium for 24 h (in the absence of insulin). Stimulation with the hormone was for 15 min with 100 nmol/L in DMEM. DAPK2 and Akt were assessed on separate membranes using lysates from the same cell batches. Phosphorylation of Akt (p Akt) on indicated amino acid residues was probed with phosphorylation-specific antibodies. **C**: At 24 h after virus transduction, terminally differentiated cells were imaged by phase contrast to measure lipid droplet (LD) size using Perfect Image software. Four images from random fields were quantified, representing >500 individual LDs in each group. LD size distributions in a representative experiment are shown. **D**: Differentiated 3T3-L1 cells were transduced with adenovirus and used for mRNA extraction after 24 h. Indicated mRNA were measured by RT-PCR, normalized to 18S mRNA, and expressed relative to the control group. RNA was obtained from at least three independent experiments. **E**: Lactate dehydrogenase release into the medium was assessed 24 h after adenovirus transduction. A representative experiment of two is shown. **F**: Lipolytic activity of terminally differentiated 3T3-L1, 24 h after transduction with indicated adenoviruses. Glycerol release into the medium was measured and normalized to cell protein content. Values for maximal isoproterenol (Iso) stimulation are set to 1, bars are means from two independent experiments. **G**: Cells expressing DAPK2 or a kinase-dead mutant version were incubated in complete medium for 2 h in the presence or absence of lysosomal inhibitors (Lys.Inh.) and lysed for Western blot analysis. **H**: Autophagic flux quantification. LC3-II/actin accumulation in the presence (vs. absence) of lysosome inhibitors is calculated from five independent experiments. BAF, bafilomycin A1; CLQ, chloroquine; LEU, leupeptin/NH₄Cl. **P* < 0.05 indicating a statistically significant difference.

adipocyte autophagic flux inversely correlated with fat cell size (Fig. 5F), which is primarily determined by lipid amounts within the unilocular lipid droplet. Thus, attenuated autophagic flux in obesity is linked with adipocyte lipid

overload. Similarly, adipocytes isolated from obese (*ob/ob*) mice also exhibited lower autophagic activity than nonobese (*ob/+*) controls (Fig. 5G and H), indicating common reduction in obese rodents and humans.

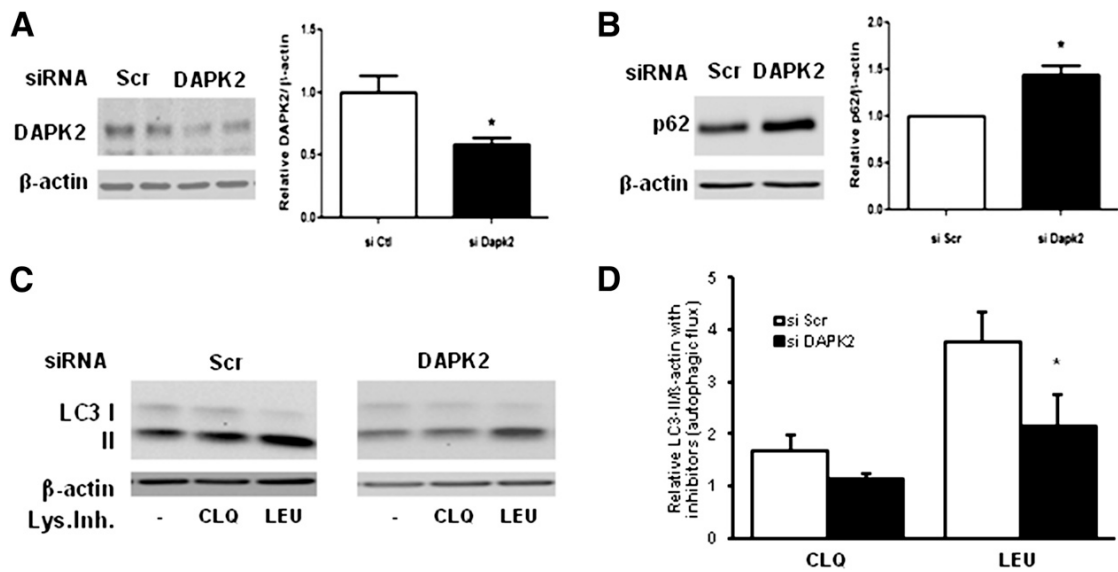


Figure 4—siRNA-mediated DAPK2 inhibition reduces autophagic flux. Effect of DAPK2 inhibition by siRNA on endogenous DAPK2 (A) and p62 (B) content. Control cells were transfected with scrambled (Scr) siRNA. C: Cells were incubated in complete serum-supplemented medium for 2 h in the presence or absence of lysosome inhibitors and lysed for Western blot analysis. D: Bars represent quantification of LC3-II accumulation with lysosome inhibitors (Lys.Inh.) (autophagic flux) as mean values \pm SEM of three independent experiments with different cell donors in which LC3-II/actin signals with no inhibitor were arbitrarily set to 1. CLQ, chloroquine; Ctrl, control; LEU, leupeptin/ NH_4Cl . * $P < 0.05$ indicating statistical significance.

Reversibility of autophagy attenuation was investigated by assessing adipocyte preparations obtained from obese patients after bariatric surgery-induced weight loss. In nine patients, adipose tissue samples were obtained pre- and postsurgery at one occasion within 3 to 12 months after the intervention. All patients lost weight and reduced subcutaneous adipocyte cell size and lipid contents (Fig. 6A), although at different degrees, because of the large time frame in postsurgery sample collection. Interestingly, total adipocyte LC3 protein content pre- versus postsurgery changed proportionally to the extent of adipocyte size reduction (Fig. 6B). Pre- versus postsurgery comparisons indicated ameliorated adipocyte autophagic clearance in all patients (Fig. 6C) and significant recovery, regardless of the use of chloroquine or leupeptin to evaluate autophagic flux (Fig. 6D and E). Thus, adipocyte lysosome-mediated remodeling is compromised in obesity, and partial recovery can be obtained by weight loss.

DISCUSSION

Increasing evidence points to the critical role of autophagy in metabolic diseases, linked to the adaptive response to chronic metabolic stress (28). In almost every tissue participating in energy homeostasis (liver, pancreas, muscle, and even hypothalamus), invalidation of autophagy by tissue-specific gene knockout was found to be associated with metabolic dysfunction (25,29–33). However, adipocyte responses are still poorly understood because invalidation of adenine thymine guanine alters normal fat tissue differentiation (34,35). Our study brings new evidence that

autophagy attenuation associates with adipocyte dysfunction in obesity. Interestingly, previous reports showed autophagy activation in adipose tissue in human or mice obesity (36–38). Noteworthy, the study of total adipose tissue takes account of obesity-associated inflammatory cells, in which autophagy is linked to immune function, so that it remains unclear from these reports in which cell type autophagy is modulated. Here, specific focus on adipocytes and direct measurement of autophagosome clearance show that obesity is associated with downregulation of adipocyte autophagic turnover, partially recovering after bypass surgery-mediated weight loss. Our data are in line with a negative role of lipids on autophagosome dynamics (39,40) and with high-fat diet-induced autophagy defects previously demonstrated in the liver (41,42), kidney (43), and hypothalamus (44).

Autophagic degradation of lipid droplets, also called lipophagy, can decrease the intracellular lipid burden in many cell types but is shown here to only marginally modulate in vitro adipocyte lipolysis. This is in good agreement with the prominent role of neutral cytoplasmic lipases in fat cell lipid mobilization (27) and suggests that autophagy might control other adipocyte phenotypes. Indeed, autophagy inhibition potentially induces cell inflammation (45), including fat cell inflammation (37,46). Furthermore, mice with systemic haploinsufficiency for the Atg7 autophagy gene overproduce reactive oxygen species in adipose tissue when obese (47). Thus, we favor the possibility that autophagy serves in the long-term to dampen adipocyte inflammation linked to metabolic dysfunctions.

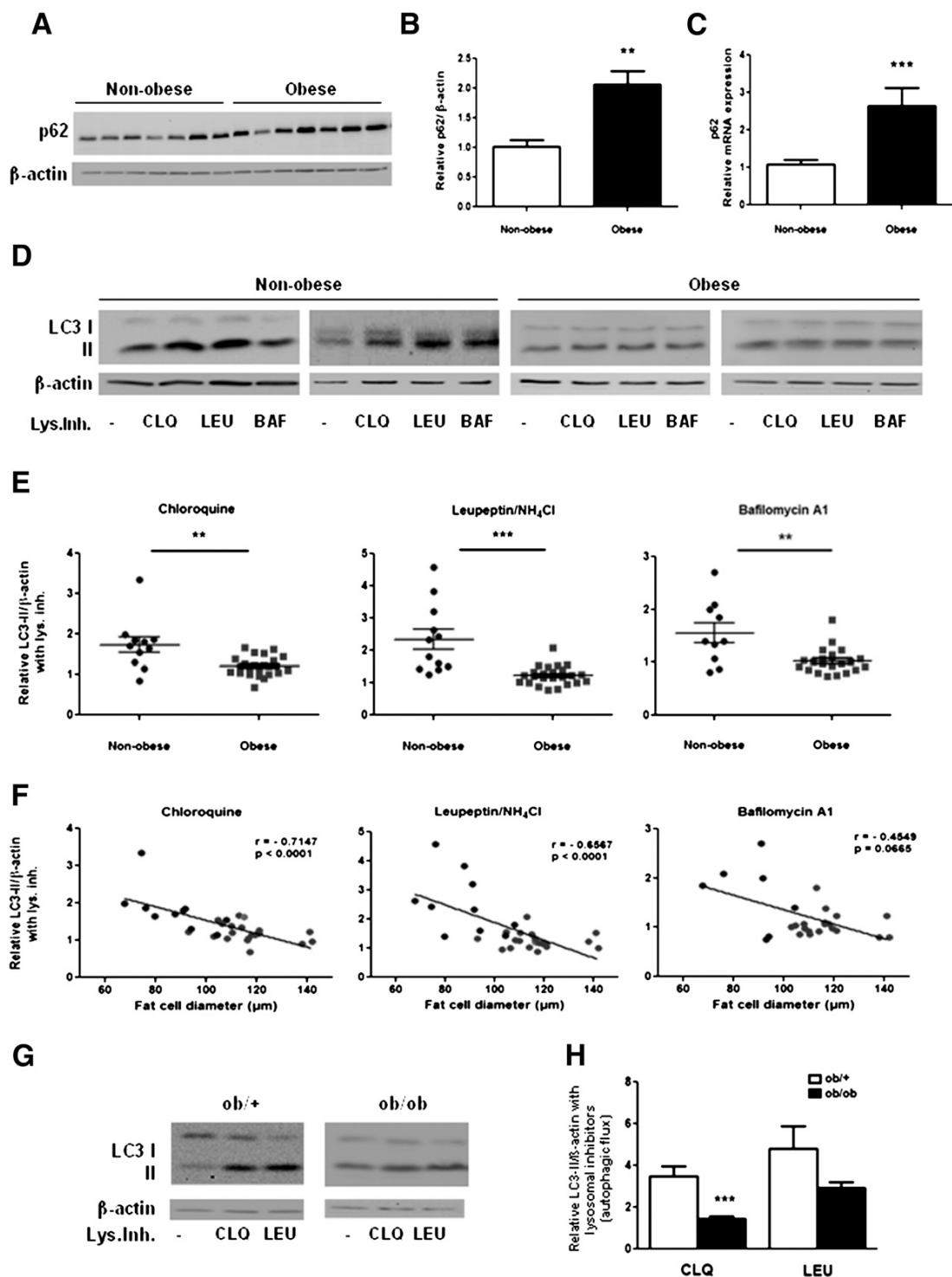


Figure 5—Decreased adipocyte autophagic clearance in human and rodent obesity. **A**: Freshly isolated adipocytes obtained by collagenase digestion of 24 obese patients and 12 nonobese control patients were lysed and proteins (15 μg) analyzed by Western blotting. **B**: A representative blot is shown with quantitative analysis of p62. **C**: p62 mRNA quantification by RT-PCR performed on adipocyte RNA preparation (10 nonobese and 14 obese patients). Values were normalized to 18S. Bars are means \pm SEM of signal intensity relative to values of nonobese control subjects set to 1. **D** and **E**: Autophagic flux in adipocytes freshly obtained from adipose tissue biopsies as in **A**. Adipocytes were incubated in DMEM medium for 2 h, with or without lysosomal inhibitors (Lys.Inh.), as indicated (chloroquine [CLQ], leupeptin/ NH_4Cl [LEU], bafilomycin A1 [BAF]). **E**: Each point represents inhibitor-induced LC3-II accumulation relative to LC3 content with

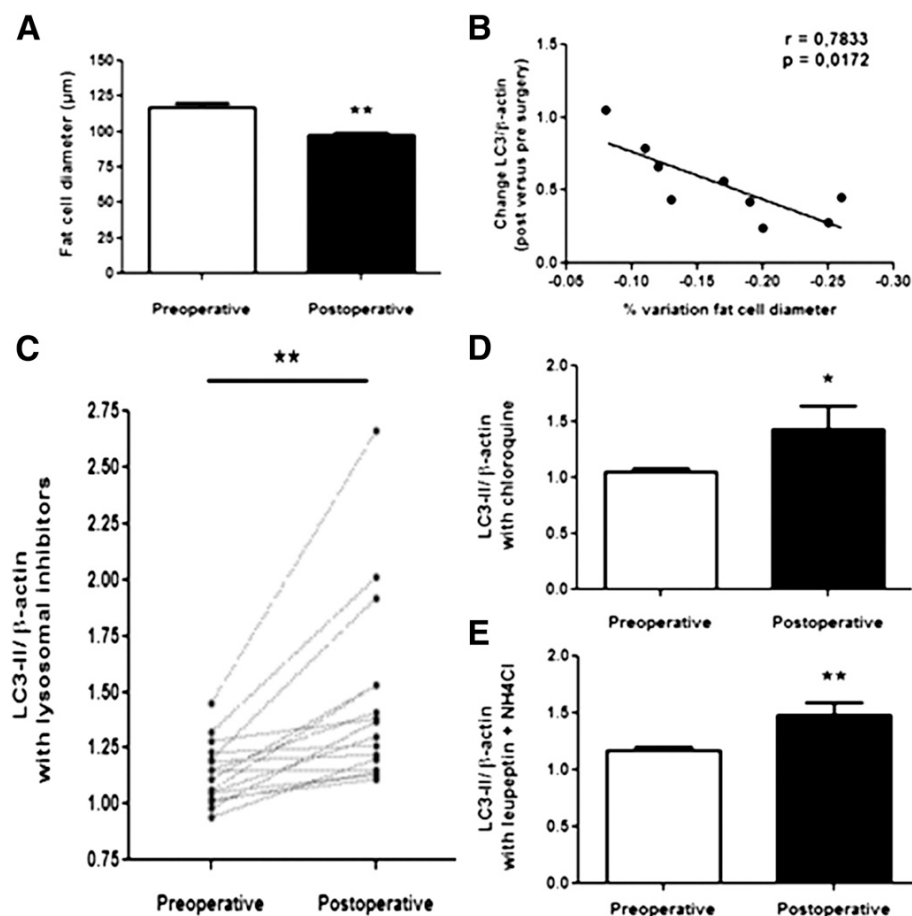


Figure 6—Recovery of autophagy by weight loss after bariatric surgery. Adipose tissue needle biopsies were obtained from nine obese patients before and after surgery (once after intervention, within 3 to 12 months). **A**: Adipocytes were isolated from the biopsy specimens and used to determine adipocyte size. **B**: Spearman correlation between change in LC3 expression and fat cell size reduction after surgery. **C–E**: Changes in adipocyte autophagic flux after surgery. Data obtained in individual cell preparations irrespective of lysosomal inhibitor are plotted in **C**. Mean values \pm SEM of pre- vs. postsurgery autophagic flux evaluated with chloroquine or leupeptin/ NH_4Cl are shown in **D** and **E**. Asterisks indicate statistical significance for P values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

The current study links obesity-related downregulation of a kinase, DAPK2, with attenuation of adipocyte autophagy. DAPK2 was reported proapoptotic when transiently overexpressed (48,49). In the context of adipose cells lines with low endogenous expression, we found no evidence for cell death induction after Ad-mediated DAPK2 protein expression. Furthermore, by retroviral-mediated gene transfer, we could obtain viable 3T3-L1 adipocyte clones stably expressing wild-type DAPK2 but not the constitutively active form. Thus, we believe that DAPK2 is not proapoptotic in the adipocyte cell environment, likely because

of fine-tuning of kinase activation by appropriate mechanisms. Our present data, rather, indicate that DAPK2 is linked to constitutive autophagy and provide evidence that kinase activity is required for this regulation. Molecular mechanisms by which DAPK2 sustains autophagic clearance are not yet elucidated but might involve the targeting of autophagy proteins still to be defined. Recently, several DAPK2 interacting partners or substrates have been identified in the autophagy protein network, including inhibitory interaction with 14-3-3, interference with mammalian target of rapamycin complex inhibition, or participation in

no inhibitor. **F**: Spearman correlation between autophagic flux and adipocyte diameter. **G** and **H**: LC3-II/actin signals in adipocytes isolated from lean (*ob/+*) or obese (*ob/ob*) mice epididymal adipose tissue incubated with or without lysosome inhibitors. **G**: Representative blots from individual mice of each genotype are shown (six mice in each group were studied). **H**: Bars represent quantifications of autophagic flux (i.e., LC3-II/actin accumulation) in the presence vs. absence of lysosome inhibitor as mean values \pm SEM. Asterisks indicate statistical significance for P values: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$.

the beclin interactome (50,51). Interestingly, DAPK2 silencing was also found to affect tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling and nuclear factor- κ B activation (52), reinforcing connections to cell inflammation. Clearly, more understanding is needed before a unified view on DAPK2 molecular action emerges, but in the context of obesity-related meta-inflammation, our present data identify the loss of DAPK2 expression and establish a link to attenuated autophagic clearance of adipocytes, revealing a potential novel actor in metabolic diseases.

Acknowledgments. The authors thank A. Kimchi (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) for providing bacterial clones containing human DAPK2 cDNA sequences and K52A kinase-dead mutant version, Xavier Le Liepvre and Françoise Lasnier (INSERM, Paris, France) for virus construction, Joan Tordjman (UMR_S 1166, Paris, France) for providing paraffin-embedded adipose tissue sections, and Jean-Luc Bouillot (Ambroise Paré Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France) for providing adipose tissue biopsies.

Funding. Financial support from Cardiovasculaire Obésité Rein Diabète (CORDDIM, Ile de France region) to H.S., from Clinical Research Program (PHRC 02076 on “adiposity signals”) to K.C., and from The French National Research Agency (ANR-14CE12-0017-02 LIPOCAMD) to I.D. is acknowledged.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Author Contributions. H.S., S.R., R.A., C.P., S.M., M.P., and C.R. performed experiments. H.S., K.C., and I.D. designed the study and wrote the manuscript. I.D. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 2014;156:20–44
- Soukas A, Cohen P, Succi ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 2000;14:963–980
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–1808
- Clément K, Viguerie N, Poitou C, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 2004;18:1657–1669
- Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:407–415
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121:2111–2117
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 2008;9:R14
- Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995;9:15–30
- Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem* 2006;75:189–210
- Szyniarowski P, Corcelle-Termieu E, Farkas T, et al. A comprehensive siRNA screen for kinases that suppress macroautophagy in optimal growth conditions. *Autophagy* 2011;7:892–903
- Farhan H, Wendeler MW, Mitrovic S, et al. MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *J Cell Biol* 2010;189:997–1011
- Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, et al. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 2005;307:1621–1625
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I: effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964;239:375–380
- Logette E, Le Jossic-Corcos C, Masson D, et al. Caspase-2, a novel lipid sensor under the control of sterol regulatory element binding protein 2. *Mol Cell Biol* 2005;25:9621–9631
- Briand N, Prado C, Mabilieu G, et al. Caveolin-1 expression and caveolae stability regulate caveolae dynamics in adipocyte lipid store fluctuation. *Diabetes* 2014;63:4032–4044
- Toubal A, Clément K, Fan R, et al. SMRT-GPS2 corepressor pathway dysregulation coincides with obesity-linked adipocyte inflammation. *J Clin Invest* 2013;123:362–379
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012;8:445–544
- Le Lay S, Briand N, Blouin CM, et al. The lipotrophic caveolin-1 deficient mouse model reveals autophagy in mature adipocytes. *Autophagy* 2010;6:754–763
- Tondu AL, Robichon C, Yvan-Charvet L, et al. Insulin and angiotensin II induce the translocation of scavenger receptor class B, type I from intracellular sites to the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:33536–33540
- Briand N, Le Lay S, Sessa WC, Ferré P, Dugail I. Distinct roles of endothelial and adipocyte caveolin-1 in macrophage infiltration and adipose tissue metabolic activity. *Diabetes* 2011;60:448–453
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453:783–787
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 2013;15:713–720
- Jegga AG, Schneider L, Ouyang X, Zhang J. Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy* 2011;7:477–489
- Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 2002;157:455–468
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009;458:1131–1135
- Ouimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I, Marcel YL. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab* 2011;13:655–667
- Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* 2013;27:459–484
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40:280–293
- Jung HS, Chung KW, Won Kim J, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 2008;8:318–324
- Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab* 2012;15:534–544
- He C, Bassik MC, Moresi V, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 2012;481:511–515
- Coupé B, Ishii Y, Dietrich MO, Komatsu M, Horvath TL, Bouret SG. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. *Cell Metab* 2012;15:247–255
- Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S, Jin S. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* 2009;5:1118–1130

34. Singh R, Xiang Y, Wang Y, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3329–3339
35. Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19860–19865
36. Kovsan J, Blüher M, Tarnowski T, et al. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E268–E277
37. Jansen HJ, van Essen P, Koenen T, et al. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* 2012;153:5866–5874
38. Nuñez CE, Rodrigues VS, Gomes FS, et al. Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:1473–1480
39. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J* 2010;24:3052–3065
40. Las G, Serada SB, Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem* 2011;286:42534–42544
41. Liu HY, Han J, Cao SY, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* 2009;284:31484–31492
42. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;11:467–478
43. Yamahara K, Kume S, Koya D, et al. Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1769–1781
44. Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B pathway. *J Biol Chem* 2011;286:32324–32332
45. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13:722–737
46. Yoshizaki T, Kusunoki C, Kondo M, et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:352–357
47. Lim YM, Lim H, Hur KY, et al. Systemic autophagy insufficiency compromises adaptation to metabolic stress and facilitates progression from obesity to diabetes. *Nat Commun* 2014;5:4934
48. Kawai T, Nomura F, Hoshino K, et al. Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene* 1999;18:3471–3480
49. Inbal B, Shani G, Cohen O, Kissil JL, Kimchi A. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20:1044–1054
50. Gilad Y, Shiloh R, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. Discovering protein-protein interactions within the programmed cell death network using a protein-fragment complementation screen. *Cell Reports* 2014;8:909–921
51. Ber Y, Shiloh R, Gilad Y, Degani N, Bialik S, Kimchi A. DAPK2 is a novel regulator of mTORC1 activity and autophagy. *Cell Death Differ* 2014;22:465–475
52. Schlegel CR, Fonseca AV, Stöcker S, et al. DAPK2 is a novel modulator of TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2014;21:1780–1791



Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation

Nicolas Tardif,^{1,2*} Jérôme Salles,^{1,2*} Christelle Guillet,^{1,2} Joan Tordjman,³ Sophie Reggio,³ Jean-François Landrier,⁴ Christophe Giraudet,^{1,2} Véronique Patrac,^{1,2} Justine Bertrand-Michel,⁵ Carole Migne,^{1,2} Marie-Laure Collin,^{1,2} Jean-Michel Chardigny,^{1,2} Yves Boirie^{1,2,6} and Stéphane Walrand^{1,2}

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, Clermont-Ferrand F-63000, France

²INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand F-63000, France

³UPMC, Inserm U872 Equipe 7, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris F-75006, France

⁴INRA, UMR 1260, Marseille 13385, France

⁵IFR30, Inserm U563, CHU Purpan, Toulouse F-31024, France

⁶CHU Clermont-Ferrand, Service de Nutrition Clinique, Clermont-Ferrand F-63003, France

Summary

Obesity and aging are characterized by decreased insulin sensitivity (IS) and muscle protein synthesis. Intramuscular ceramide accumulation has been implicated in insulin resistance during obesity. We aimed to measure IS, muscle ceramide level, protein synthesis, and activation of intracellular signaling pathways involved in translation initiation in male Wistar young (YR, 6-month) and old (OR, 25-month) rats receiving a low- (LFD) or a high-fat diet (HFD) for 10 weeks. A corresponding cellular approach using C2C12 myotubes treated with palmitate to induce intracellular ceramide deposition was taken. A decreased ability of adipose tissue to store lipids together with a reduced adipocyte diameter and a development of fibrosis were observed in OR after the HFD. Consequently, OR fed the HFD were insulin resistant, showed a strong increase in intramuscular ceramide level and a decrease in muscle protein synthesis associated with increased eIF2 α phosphorylation. The accumulation of intramuscular lipids placed a lipid burden on mitochondria and created a disconnect between metabolic and regulating pathways in skeletal muscles of OR. In C2C12 cells, palmitate-induced ceramide accumulation was associated with a decreased protein synthesis together with upregulated eIF2 α phosphorylation. In conclusion, a reduced ability to expand adipose tissues was found in OR, reflecting a lower lipid buffering capacity. Muscle mitochondrial activity was affected in OR conferring a reduced ability to oxidize fatty acids entering the muscle cell. Hence, OR were more prone to ectopic muscle lipid accumulation than YR, leading to decreased muscle protein anabolism. This metabolic change is a potential therapeutic target to counter sarcopenic obesity.

Correspondence

Stéphane Walrand, Laboratoire de Nutrition Humaine, 58 rue Montalembert, BP 321, 63009 Clermont-Ferrand Cedex 1, France. Tel.: +33 4 73 60 82 76; fax: +33 4 73 60 82 55; e-mail: swalrand@clermont.inra.fr

*These authors contributed equally to this work

Accepted for publication 19 July 2014

Key words: ceramide; eIF2 α signaling; high-fat diet; muscle protein synthesis; obesity; sarcopenia.

Introduction

Fat mass increases from 20% to 40% between ages 20 and 80 years, and lipid deposition is modified, with increased liver and skeletal muscle fat infiltration. This age-associated adiposity acts synergistically with sarcopenia, worsening disability through 'sarcopenic obesity'. Increased lipid accumulation in many tissues is associated with the appearance of insulin resistance (Slawik & Vidal-Puig, 2007). Inversely, promoting the storage of fat preferentially in adipose tissue with adiponectin transgenic ob/ob mice or peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonist treatment improved insulin sensitivity (Kim *et al.*, 2007). Besides increasing the storage capacity of fat in adipocytes, increasing fatty acid oxidation in muscle can also prevent lipotoxicity (Henique *et al.*, 2010). Very old transgenic PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha) mice showed increased muscle mitochondrial activity and improved metabolic responses as illustrated by decreased circulating lipid levels and increased insulin sensitivity (Tiraby *et al.*, 2007; Wenz *et al.*, 2009).

The increased lipid content inside muscle in older persons is independently associated with insulin resistance (Ryan & Nicklas, 1999; Zoico *et al.*, 2010), and a moderate weight loss improves muscle lipid infiltration and insulin resistance in postmenopausal women (Mazzali *et al.*, 2006). Muscle fat accumulation in older people is associated not only with metabolic abnormalities, but also with reduced strength and poorer scores in performance tests and incident mobility disability (Goodpaster *et al.*, 2001; Zoico *et al.*, 2010). Further, the increase in intramuscular fats coincides longitudinally with the progressive muscle weakening seen in aging (Delmonico *et al.*, 2009).

Thus, besides the effect of muscle fat accumulation on insulin sensitivity, muscle lipid accumulation may also promote specific changes in muscle protein metabolism. Some indirect evidence has given support to this hypothesis. Muscle protein synthesis is blunted in obese young (Guillet *et al.*, 2009) and older (Katsanos & Mandarino, 2011) subjects in relation with body fatness, suggesting that increased adipose tissue mass or ectopic lipid deposition may impair skeletal muscle protein synthesis. Anderson and coworkers (Anderson *et al.*, 2008b) noted a significant reduction in the ability of muscles from mice fed a high-fat diet to stimulate protein synthesis following a meal, but intramuscular lipid content was not measured. These data suggest that lipid accumulation following a chronic high-fat diet interferes with signaling pathways involved in muscle response to anabolic stimuli, blunting the activation of protein synthesis.

We hypothesized that metabolic changes in response to dietary lipids during aging were implicated in the loss of muscle mass through lipid infiltration and altered translational regulation in old rats. We first tested the impact of muscle lipid accumulation on protein synthesis rate in old sarcopenic rats fed a high-fat 'Western' diet. Second, we measured the effect of lipid infiltration, by modulating ceramide content, on protein synthesis rate and its translational regulation in C2C12 muscle cells.

Table 1 Characteristics of the rats

	YLF	YHF	OLF	OHF
Body weight (g)				
Before diets	476 ± 19	478 ± 19	625 ± 39	623 ± 33
After diets	592 ± 3*	696 ± 12***	637 ± 19	693 ± 33
Hindlimb muscle weight (g)	19.2 ± 0.2	19.4 ± 0.3	12.6 ± 0.9**	9.4 ± 0.8*****
Tibialis anterior muscle weight (g)	1.99 ± 0.07	1.91 ± 0.06	0.68 ± 0.03**	0.53 ± 0.04**
Body fat depots (g)				
Intra-abdominal fat mass	11.7 ± 0.8	22.8 ± 1.9***	14.6 ± 1.3	19.9 ± 2.3*****
Peri-epididymal fat mass	10.9 ± 0.6	19.7 ± 1.1***	11.3 ± 1.2	15.8 ± 1.8*****
Glucose (mmol/L)	8.1 ± 0.8	9.2 ± 1.4	7.3 ± 0.5	8.8 ± 0.8
Insulin (ng/mL)	0.58 ± 0.06	1.04 ± 0.28	0.74 ± 0.26	0.56 ± 0.15
Leptin (ng/mL)	3.1 ± 0.3	5.3 ± 0.4***	3.6 ± 0.3	5.5 ± 1.0***
Adiponectin (ng/mL)	4.8 ± 0.6	4.2 ± 0.3	5.1 ± 0.4	5.8 ± 0.8
Triglycerides (g/L)	1.01 ± 0.10	0.81 ± 0.08	0.91 ± 0.17	0.99 ± 0.12
FFA (mmol/L)	0.53 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.71 ± 0.02*****
Total cholesterol (g/L)	0.78 ± 0.07	0.62 ± 0.03	0.81 ± 0.05	0.9 ± 0.04***
sTNF-R1 (pg/mL)	234.3 ± 18.5	233 ± 14.8	307.5 ± 42.3	380.8 ± 62.8*****
sTNF-R2 (pg/mL)	1146 ± 55	1260 ± 71	1200 ± 65	1644 ± 45*****

Values ± SEM for eight animals per group.

YLF, young rats fed a low-fat diet, YHF, young rats fed a high-fat diet, OLF, old rats fed a low-fat diet, OHF, old rats fed a high-fat diet, FFA, free fatty acids.

* $P < 0.05$ vs. before diet, ** $P < 0.05$ age effect (same diet), *** $P < 0.05$ diet effect (same age).

Results

Aging alters the pathogenesis of diet-induced obesity

The young rats developed diet-induced obesity (DIO) with the high-fat diet, as shown by increased body weight and body fat deposits (Table 1). There was no apparent difference in body weight between old control and old high-fat groups, although adipose tissue amounts were slightly increased in the old high-fat rats. Of note, the young rats became more obese than the old ones. In further support of our previous findings (Zangarelli *et al.*, 2006), hindlimb muscle weight was significantly reduced by age, in particular type 2 fiber muscle weight (Table 1). In addition, compared with control group, 10 weeks of high-fat diet (HFD) were responsible for a significant decrease in hindlimb muscle weight in

old rats. Therefore, with both advancing age and DIO, muscle mass declined while body fat rose in rats. This inverse relationship has led to the concept of sarcopenic obesity, implying an age-dependent molecular link between body and muscle fat accumulation, insulin resistance and the decline of muscle mass.

Although fasting glycemia and insulinemia were not changed, data from the intraperitoneal glucose tolerance test indicated that impaired glucose tolerance was concomitant with obesity in old rats (Table 1 and Fig. 1A). In old adults (25-month-old rats), the obesity in rats fed the HFD was morbid and associated with resistance to insulin, in particular in skeletal muscle as illustrated by the reduced Akt activation (Fig. 1B). Consistent with these data, blood concentration of free fatty acids (FFA), cholesterol and inflammation markers, that is, cytokines, were increased considerably in old rats fed the high-fat diet (Table 1).

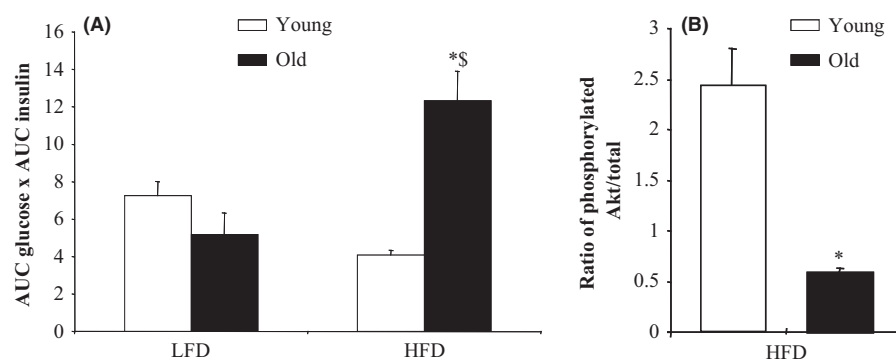


Fig. 1 Whole-body and skeletal muscle insulin sensitivity indices in young and old rats fed a low-fat or a high-fat diet for 10 weeks. (A) Index of whole-body insulin resistance measured by intraperitoneal glucose tolerance test. Insulin resistance was estimated by the product of the area under the curve (AUC) of the glucose and the AUC of insulin after intraperitoneal glucose infusion. (B) Akt phosphorylation state in tibialis anterior muscle. Phosphorylated Akt to total Akt protein content ratio was measured by Western blot. Values ± SEM for eight animals per group. * $P < 0.05$ age effect (same diet), $^{\$}P < 0.05$ diet effect (same age). LFD, low-fat diet; HFD, high-fat diet.

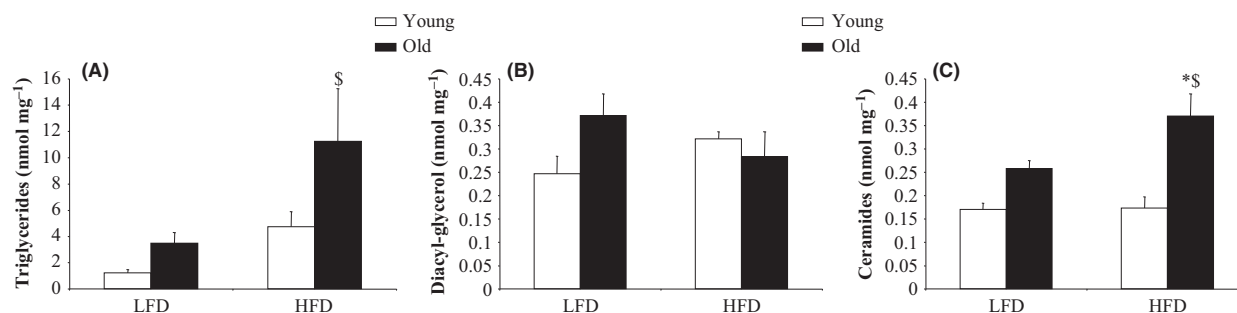


Fig. 2 Triglyceride, diacyl-glycerol, and ceramide content in tibialis anterior muscle of young and old rats fed a low-fat or a high-fat diet for 10 weeks. Triglyceride (A), diacyl-glycerol (B), and ceramide (C) concentrations in tibialis anterior muscle were analyzed by gas-liquid chromatography after total lipid extraction. Ceramide, diacyl-glycerol (DAG) and triglyceride (TG) concentrations are expressed as nmoles/mg proteins. Values \pm SEM for five animals per group. * $P < 0.05$ age effect (same diet), $^{\S}P < 0.05$ diet effect (same age). LFD, low-fat diet; HFD, high-fat diet.

Diet-induced obesity promotes adipose tissue fibrosis and inflammation and muscle lipid infiltration in old rats due to altered mitochondrial activity

The chemical determination of the concentration of fat-reactive species in muscle tissue revealed more intramuscular lipids in old rats than in young ones, notably after DIO (Fig. 2). More remarkably, however, variation in lipid metabolites in muscle tissue differed, with a considerable increase in triglycerides (TG) and ceramides and an apparent stability of diacyl-glycerol (DAG) concentration in the muscles of the old obese rats. Previous studies (Hulver *et al.*, 2003, 2005; Petersen *et al.*, 2003) suggest that insulin resistance development during aging is related to an increase in intramyocellular fatty acid metabolites that may result from an age-associated reduction in mitochondrial oxidative activity. Aging affected the activity of mitochondrial 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD), a key enzyme of the β -oxidation cycle, conferring on old rats a reduced ability to oxidize fatty acids entering the muscle cell (Table 2). Because balanced proportions of mitochondrial complex activities of mitochondria are required for the normal electron transport chain to function, the calculation of ratios of complex activities is

considered as a good index of mitochondrial activity (Miro *et al.*, 2000; Zangarelli *et al.*, 2006). Tibialis anterior ratios of complex I to complexes II and III were markedly reduced in DIO old rats compared with control old and young obese rats (Table 2). Also, ratios of complex II to complex IV activities were increased in the same group of old rats. Overall, these findings were linked to a specific 30% reduction in complex I and IV activities in high-fat diet-fed animals. In agreement with the disorganization of the mitochondrial complex activities in DIO old rats, there was a decrease in transcript levels of PGC1 α , a transcriptional co-activator playing a multifaceted role in the regulation of mitochondrial energy metabolism and biogenesis. Specifically, PGC1 α influences lipid utilization in muscle cells (Anderson *et al.*, 2008a). Of note, mitochondrial complexes I and IV are targets of PGC-1 transcriptional activity.

Histological analysis of abdominal adipose tissue revealed increased immune cell accumulation in old rats not only in DIO rats, but also in control animals (Fig. 3A). This observation was confirmed when the transcript levels of three major inflammatory intermediates of adipose tissue were analyzed, that is, TNF α , IL1 β and MCP1 gene expressions (Fig. 3D–F). The morphological changes in adipose tissue were also

Table 2 Alteration in mitochondrial activity in tibialis anterior muscles from young and old rats fed a control or a high-fat diet for 10 weeks

	YLF	YHF	OLF	OHF
Enzyme activities (nmol min ⁻¹ mg mito proteins ⁻¹)				
HAD	303 \pm 30	327 \pm 11	220 \pm 13*	270 \pm 24*
CS	4.1 \pm 0.52	4.21 \pm 0.20	3.98 \pm 0.2	4.64 \pm 0.24**
Complex I/II	0.93 \pm 0.11	0.81 \pm 0.09	0.77 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03*,**
Complex I/III	5.63 \pm 1.08	6.16 \pm 1.41	7.45 \pm 1.70	3.49 \pm 0.53*,**
Complex I/IV	0.027 \pm 0.004	0.019 \pm 0.001	0.019 \pm 0.001	0.017 \pm 0.001
Complex II/III	6.87 \pm 1.19	7.33 \pm 1.11	8.57 \pm 1.64	6.52 \pm 0.77
Complex II/IV	0.024 \pm 0.002	0.025 \pm 0.002	0.024 \pm 0.001	0.032 \pm 0.002*,**
Complex III/IV	0.004 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001	0.003 \pm 0.001	0.005 \pm 0.001*,**
Transcript levels (A.U.)				
TFAM	1.91 \pm 0.32	1.72 \pm 0.28	1.35 \pm 0.26	1.78 \pm 0.36
PGC1a	1.17 \pm 0.15	1.18 \pm 0.16	0.9 \pm 0.16	0.78 \pm 0.12**
NRF1	0.79 \pm 0.21	0.97 \pm 0.24	0.65 \pm 0.13	0.89 \pm 0.16
NRF2a	1.86 \pm 0.33	2.01 \pm 0.26	1.58 \pm 0.27	1.76 \pm 0.28

Values \pm SEM for eight animals per group. * $P < 0.05$ age effect (same diet), ** $P < 0.05$ diet effect (same age). Mitochondrial activity was HAD and CS activities, ETC complex activity ratios and mRNA expression of mitochondrial transcriptional factors. YLF, young rats fed a low-fat diet, YHF, young rats fed a high-fat diet, OLF, old rats fed a low-fat diet, OHF, old rats fed a high-fat diet, HAD, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, CS, citrate synthase, TFAM, mitochondrial transcription factor A, PGC1 α , PPAR gamma coactivator 1-alpha, NRF1 and 2 α , nuclear respiratory factors 1 and 2 alpha.

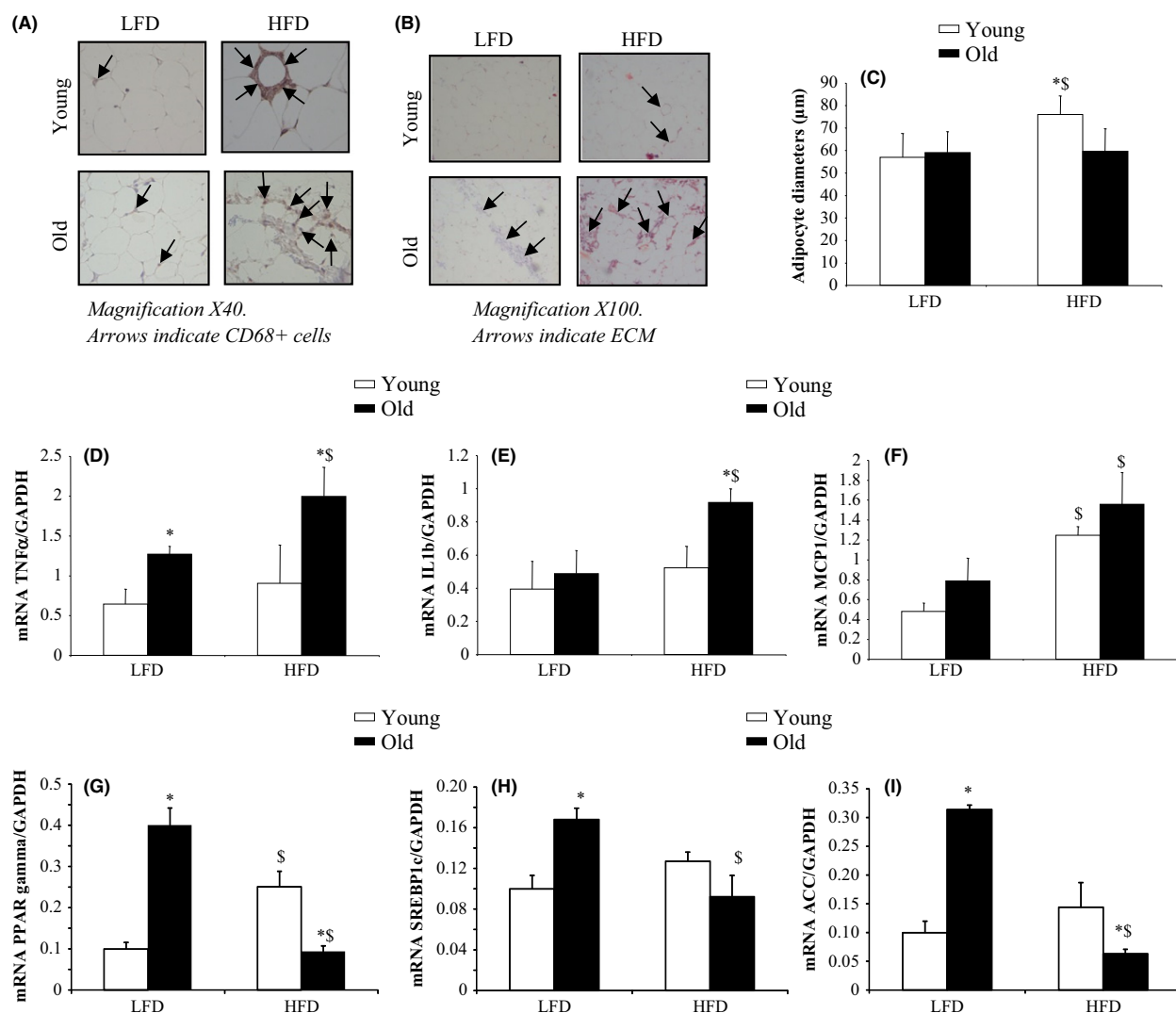


Fig. 3 Histological analysis of CD68+ macrophages and extracellular matrix staining, adipocyte diameters and transcript levels of inflammation and adipogenesis markers in abdominal adipose tissue of young and old rats fed a low-fat or a high-fat diet for 10 weeks. Immunohistochemical detection of CD68+ macrophages (A) was performed with the avidin–biotin peroxidase method. Slides of abdominal adipose tissue were stained with picosirius red to detect areas of fibrosis (B). Adipocyte diameters were measured using PERFECTIMAGE software (Claravision, France) (C). mRNA transcript levels of TNF α , IL1 β , MCP1, PPAR γ , SREBP1c, and acetyl-CoA carboxylase (ACC) in abdominal adipose tissue were measured by real-time Q-PCR (D–I). Data are expressed as a ratio of gene expression to GAPDH gene expression. Values \pm SEM for eight animals per group. * P < 0.05 age effect (same diet), $^{\$}$ P < 0.05 diet effect (same age). LFD, low-fat diet; HFD, high-fat diet.

characterized by lower cell diameter and increased fibrosis in old high-fat rats (Fig. 3B,C). The defect in adipogenesis in DIO old rats was confirmed by the decreased expression of key genes of adipogenic enzymes, that is, acetyl-CoA carboxylase (ACC), and transcription factors involved in adipogenesis regulation, that is, PPAR γ and SREBP1c (Fig. 3G,H,I).

Protein synthesis rate is reduced, and translational eIF2-dependent regulation is affected by diet-induced obesity in old rats

The synthesis rate of muscle total and mitochondrial proteins and of myosin and actin, two major contractile proteins, fell dramatically in

DIO old rats, that is, by ~18–23%, compared with control old rats (Fig. 4A–D). No difference in muscle protein synthesis rate emerged in young rats, except for myosin synthesis, which was significantly increased in obese young rats (+ 30%). Physiologically, the increase in muscle protein synthesis after feeding represents a component of the marked postprandial anabolism which leads to growth and tissue renewal. Here, we observed a lower sensitivity of muscle protein synthesis to nutritional state in DIO old rats (Fig. 4F).

Exposure of muscle to growth or stress factors can change protein translation initiation via the mTOR and its downstream S6k and 4E-BP1, eIF2B and eIF2 α pathways (Kennedy & Kaeblerlein, 2009; Kapahi *et al.*, 2010; Kaeblerlein & Kennedy, 2011).

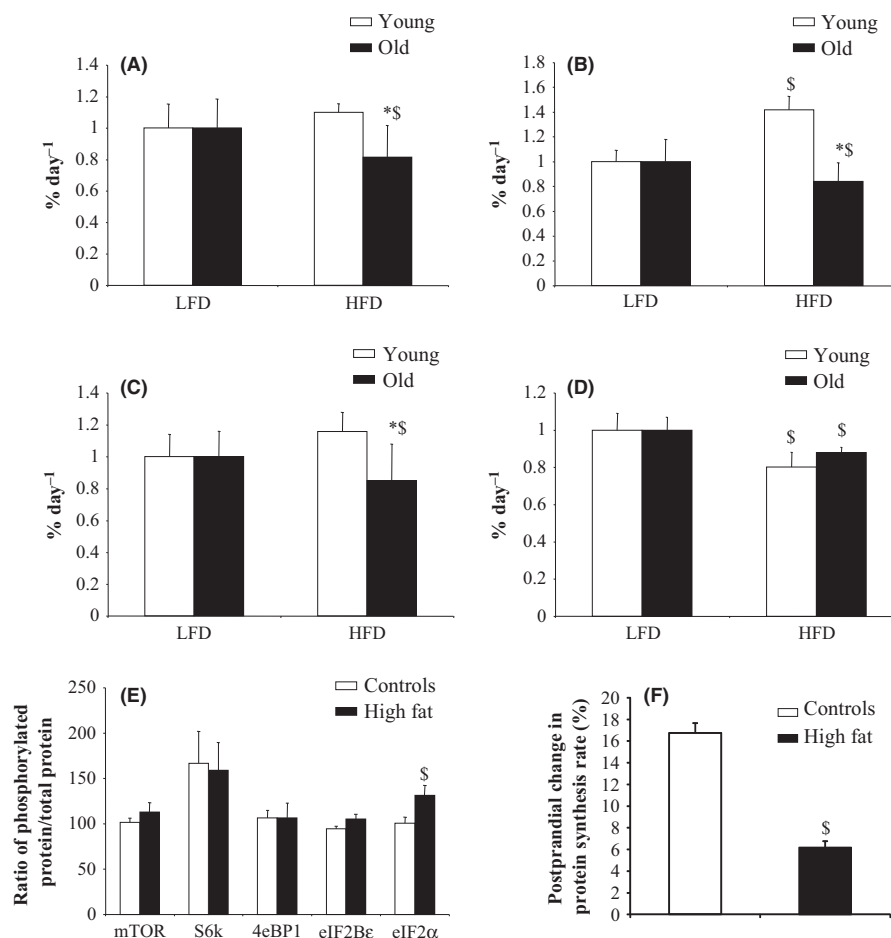


Fig. 4 Protein synthesis rate and activation of intracellular pathways related to the regulation of translational initiation in tibialis anterior muscle of young and old rats fed a low-fat or high-fat diet for 10 weeks. Total muscle protein (A) and muscle protein fractions, that is, myosin (B), actin (C), and mitochondrial proteins (D), were isolated, and the rate of protein synthesis was calculated as the ratio of the isotopic enrichment in proteins to the enrichment of the precursor pool of free amino acids. Protein synthesis rates in tibialis anterior muscle are expressed as %/d. The activation of specific intracellular pathways regulating translational initiation in tibialis anterior muscle was assessed in old rats by measuring the phosphorylation state of key intermediates (E). Ratio of phosphorylated protein to total protein content was measured by Western blot. Muscle protein synthesis rate was also measured after food intake in old rats (F). Postprandial protein synthesis rates in tibialis anterior muscle are expressed as % of change compared with postabsorptive values. Values \pm SEM for eight animals per group. * $P < 0.05$ age effect (same diet), \$ $P < 0.05$ diet effect (same age). LFD, low-fat diet; HFD, high-fat diet.

Total protein expressions and phosphorylation levels were similar between young control and young obese rats (data not shown). Within the old group, the phosphorylation of mTOR, S6k, 4E-BP1 and eIF2B was not affected by DIO. However, protein phosphorylation status of eIF2 α was significantly increased in old rats under DIO, a 32% increase in the ratio of phosphorylated eIF2 α to total eIF2 α being detected in old HF rats (Fig. 4E). A 20–30% increase in the phosphorylation of eIF2 α frequently suffices to sequester eIF2B in an inactive complex so that recycling of eIF2 is largely inhibited (Kimball *et al.*, 2002; Kapahi *et al.*, 2010).

Cultured C2C12 myotubes display reduced protein synthesis and altered eIF2 α -dependent translational regulation driven by ceramides

As in previous reports (Chavez *et al.*, 2003), myotubes treated with palmitate generated large amounts of reactive lipids, 1.9–7 times more

than basal levels for intracellular TG, DAG and ceramide concentrations (Fig. 5). The concentration of palmitate used in this study is comparable with that found physiologically and is similar to that used in earlier studies evaluating FFA effects in both immortalized muscle cells (Schmitz-Peiffer *et al.*, 1999; Storz *et al.*, 1999; Chavez *et al.*, 2003) and isolated skeletal muscle strips (Thompson *et al.*, 2000). Pretreating C2C12 myotubes with fumonis B1 (FB1), a fungal toxin that inhibits ceramide synthase, completely prevented the palmitate-induced increase in ceramide levels, but had no effect on TG and DAG accumulation (Fig. 5).

A 30% decrease in protein synthesis rate was seen after incubation of differentiated myotubes with palmitate (Fig. 6A). By contrast, after treatment with oleate, C2C12 myotubes generated amounts of proteins equivalent to those from classically cultured control cells. As expected, blocking ceramide metabolism while concomitantly adding palmitate totally prevented palmitate induction of protein synthesis inhibition in

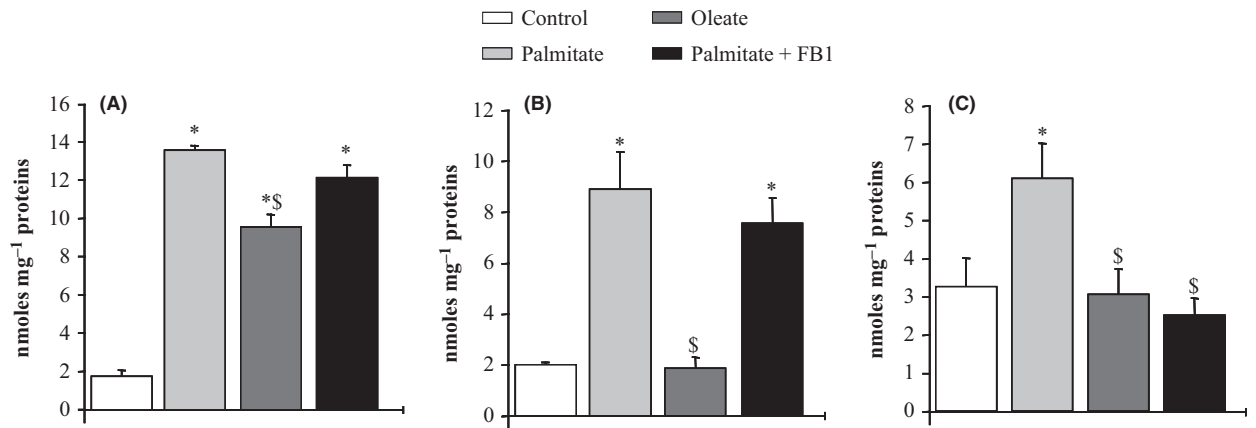


Fig. 5 Triglyceride, diacyl-glycerol, and ceramide content in C2C12 myotubes incubated in the presence or absence of fatty acids and of an inhibitor of ceramide synthesis. C2C12 myotubes were incubated in the presence or absence of palmitate (0.375 mM), oleate (0.375 mM), or fumonis B1 (FB1, 50 μ M) for 16 h before lipid extraction. Triglyceride (A), diacyl-glycerol (B), and ceramide (C) concentrations were analyzed by gas-liquid chromatography. Ceramide, diacyl-glycerol, and triglyceride concentrations are expressed as nmoles/mg proteins. Data are from six independent experiments. Values \pm SEM. **P* < 0.05 vs. control cells, $^{\$}$ *P* < 0.05 vs. cells treated with palmitate.

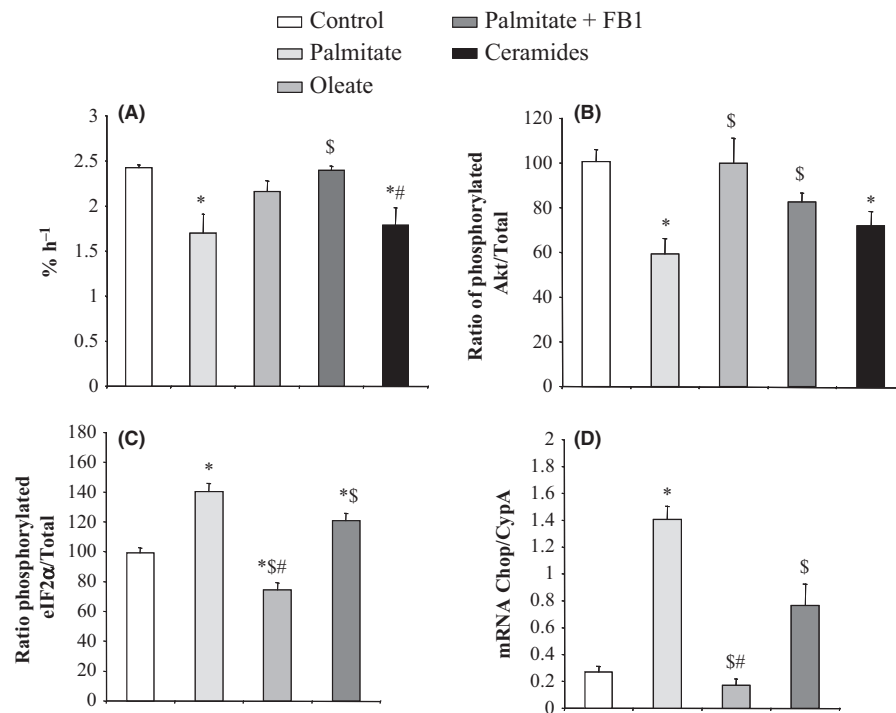


Fig. 6 Protein synthesis rate and activation of intracellular pathways related to the regulation of translational initiation in C2C12 myotubes incubated in the presence or absence of fatty acids and of pharmacological mediators of intracellular ceramide content. C2C12 myotubes were incubated in the presence or absence of palmitate (0.375 mM), oleate (0.375 mM), and fumonis B1 (FB1, 50 μ M) for 16 h or C2-ceramide (100 μ M) for 30 min before insulin stimulation (100 nM). Proteins were isolated, and protein synthesis rate (A) was determined as in Fig. 4. Protein synthesis rates in C2C12 myotubes are expressed as %/h. Data are from six independent experiments. The activation of specific intracellular pathways regulating translational initiation was assessed by measuring the phosphorylation state of key intermediates (B,C). Ratio of phosphorylated protein to total protein content was measured by Western blot. The implication of eIF2 α in the regulation of protein translation in C2C12 myotubes treated with fatty acids was confirmed by measuring the mRNA expression of CHOP gene (D), one of the targets of eIF2 α . All the data are from six independent experiments. Values \pm SEM. **P* < 0.05 vs. control cells, $^{\$}$ *P* < 0.05 vs. cell treated with palmitate, and $^{\#}$ *P* < 0.05 vs. cells treated with palmitate and FB1.

myotubes. Finally, the use of short-chain ceramides recapitulated the effects of palmitate on the inhibition of protein synthesis in differentiated muscle cells (Fig. 6A).

As reported elsewhere (Merrill, 2002; Chavez *et al.*, 2003), palmitate markedly inhibited insulin stimulation of Akt phosphorylation (Fig. 6B). By contrast, neither oleate nor FB1 pretreatment had any effect. Of

note, the same effect that we noted with palmitate was observed when ceramide was directly used to treat C2C12 myotubes. Thus, increasing endogenous ceramide levels by an alternative mechanism recapitulated the inhibitory effects of palmitate on Akt phosphorylation state.

In line with our *in vivo* data, the decreased protein synthesis observed in C2C12 myocytes after palmitate incubation was not associated with any difference in the phosphorylation state of mTOR and its substrates S6K and 4E-BP1, compared with the control values (data not shown). The phosphorylation state of eIF2 α also appeared to be preserved in C2C12 cells in all conditions (data not shown). By contrast, it is noteworthy that palmitate seemed to upregulate eIF2 α phosphorylation level in myotubes, that is, eIF2 α was highly phosphorylated in myotubes after palmitate treatment (Fig. 6C). A significant protective effect of oleate on eIF2 α phosphorylation was seen compared with either palmitate treatment or control cells (Fig. 6C). FB1 treatment significantly blunted the effect of palmitate on eIF2 α phosphorylation (Fig. 6C). In addition to its repressive action of protein translation initiation, the downstream effect of eIF2 α is the induction of genes, such as CHOP (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein) (Salminen & Kaarniranta, 2010). Interestingly, in the present work, the evolution of CHOP gene expression after FFA treatments fully corresponded to eIF2 α phosphorylation changes in C2C12 myotubes (Fig. 6D).

Discussion

Obesity has been suggested as a risk factor for sarcopenia. However, the underlying pathogenic concept of sarcopenic obesity is mainly based on phenotypical data from clinical observation (Bollheimer *et al.*, 2012). The present study describes a rodent animal model which opens up prospects to carry out translational research of sarcopenic obesity in an experimental setting. Our observations support defective plasticity of adipose tissues with age as shown by the lower adipocyte diameter in old DIO rats. These data are evidence of a decline with age in the expandability and storability of adipose tissue under positive energy balance. Accordingly, preadipocytes isolated from old animals accumulate lipids less extensively than cells from young animals, even after weeks in culture under identical conditions (Djian *et al.*, 1983; Kirkland *et al.*, 1990). In the present study, gene expressions of different adipogenic enzymes, that is, acetyl-CoA carboxylase (ACC), and transcription factors involved in adipogenesis regulation, that is, PPAR γ and SREBP1c, were reduced in the abdominal adipose tissue of old DIO rats. Kirkland *et al.* have proposed that preadipocyte overutilization with aging induces cellular senescence, leading to impaired adipogenesis, failure to sequester lipotoxic fatty acids, and inflammatory cytokine and chemokine generation (Tchonia *et al.*, 2010). As inflammation, for example, TNF α abundance, is anti-adipogenic (Karagiannides *et al.*, 2001, 2006; Kirkland *et al.*, 2002), we speculated that decreased adipogenesis with aging could result, at least partially, from effects of DIO on pro-inflammatory cytokine production in adipose tissues of old rats. In the present work, increased abdominal adipose tissue inflammation in DIO old animals was associated with a greater number of macrophages, probably due to the increased expression of MCP1. In addition, it was previously reported that under culture conditions in which macrophages were absent, preadipocytes from old animals produced sufficient TNF α to inhibit their own adipogenesis, as evident from TNF α siRNA experiments (Tchonia *et al.*, 2010). Coupled with high numbers of macrophages and pro-inflammatory cytokines, adipose tissue, with its potentially high concentrations of cytotoxic FFAs, may be an especially harsh environment. This environment could damage preadipocytes and increase the production of

extracellular matrix components, leading to accelerated adipose tissue fibrosis (Keophipath *et al.*, 2009; Divoux & Clement, 2011), as observed here. It was demonstrated that the co-culture of macrophages with adipocytes caused the macrophages to take on a more alternatively activated (M2) phenotype, which would be expected to promote fibrosis (Spencer *et al.*, 2010). Therefore, during aging, the disproportionate accumulation of extracellular matrix components due to high inflammation and lack of remodeling of adipose tissue extracellular matrix may contribute to a failure to expand adipose tissue mass during states of excess caloric intake.

Owing to this effect and to a consequent failure to adequately take up and buffer circulating FFAs, plasma concentration of FFAs was raised in old DIO rats, leading to lipid redistribution and to ectopic lipid accumulation in lean tissues. Previous data revealed accumulating fat depots in skeletal muscle in older subjects, leading to metabolic dysfunction through lipotoxicity and to insulin resistance (Petersen *et al.*, 2003; Zoico *et al.*, 2010). As in Humans, old control rats displayed fat redistribution, with increased reactive lipid infiltration in skeletal muscle. Interestingly, muscle fat accumulation was strongly enhanced in DIO old rats. In these rats, fatty acids were partly sequestered as less reactive TG within muscle, protecting it against their lipotoxicity. However, a large proportion was converted to ceramides. This subsequent accumulation of lipids within skeletal muscle is known to be associated with several harmful health outcomes such as insulin resistance (Consitt *et al.*, 2009). Likewise, insulin resistance was observed in old DIO rats and was related to ectopic fat accumulation. The systemic dysregulation of glucose homeostasis was associated with a decreased ability to upregulate muscle insulin pathway, that is, low Akt phosphorylation state, in old rats fed a high-fat diet. As skeletal muscle is mostly responsible for insulin-stimulated glucose uptake (DeFronzo *et al.*, 1985), increased intramuscular fat may be responsible for the decline in glucose tolerance reported in the present work, as previously shown (Pan *et al.*, 1997). Several previous studies using different models in animals indicate that chronic exposure to high-fat diet causes severe insulin resistance by increasing fat infiltration inside muscle tissue (Blachnio-Zabielska *et al.*, 2010; De Vogel-van den Bosch *et al.*, 2010; Ritchie *et al.*, 2011). As ceramide synthesis is stimulated by adipocyte-derived cytokines, including TNF α , the systemic and tissular pro-inflammatory state associated with DIO may contribute to muscle lipid infiltration in old rats.

Different intracellular mechanisms have been proposed to explain the ceramide-induced effect on insulin resistance in skeletal muscle. In the present study, palmitate increased ceramide content, inhibiting Akt phosphorylation stimulated by insulin in C2C12 myotubes. Interestingly, the inhibition of *de novo* ceramide synthesis abolished the reduction of Akt phosphorylation in myotubes after palmitate pretreatment, and the use of short-chain ceramides recapitulated the effects of this fatty acid. Therefore, as demonstrated in the model of C2C12 myotubes, ceramide accumulation in muscle tissue was probably one of the direct causes affecting insulin sensitivity in DIO old rats.

High-fat diet and FA accumulation in muscle tissue are also known to cause mitochondrial changes (Bonnard *et al.*, 2008; Lambertucci *et al.*, 2008). In this study, we have shown that the activity of HAD, a key enzyme for mitochondrial β -oxidation, is affected by age. This observation is evidence in support of a defect in the capacity to oxidize fatty acids and so is probably one of the mechanisms contributing to fatty acid accumulation in skeletal muscle of old DIO rats. Similarly, high-fat diet led to a decrease in both the respiratory chain complex I and IV activities and PGC1 α mRNA level in old rats. PGC1 α regulates mitochondrial energy metabolism and biogenesis and influences carbohydrate and lipid utilization through activation of members of the nuclear receptor family

(Anderson *et al.*, 2008a). Old mice overexpressing PGC1 α in skeletal muscle were protected against the decline in mitochondrial function and did not develop age-related insulin resistance (Wenz *et al.*, 2009). Interestingly, the increased muscle PGC1 α expression not only prevents age-associated weight gain and body TG accumulation, but also has a significant beneficial effect on age-associated muscle loss in mice. Therefore, maintenance of muscle lipid content, by preventing the decline in mitochondrial function, improved insulin action and preserved muscle mass during aging (Wenz *et al.*, 2009). Interestingly, we previously reported that caloric restriction in old rat is associated with an improved capacity to oxidize lipids in skeletal muscle, that is, increased mitochondrial oxidative activity, together with a significant increase in muscle protein synthesis rate, in muscle mass and in muscle strength (Zangarelli *et al.*, 2006; Walrand *et al.*, 2011).

In this report, we demonstrate that the provision of a cell-permeable ceramide to C2C12 myotubes results in a significant inhibition of the rate of cellular protein synthesis. This effect was mimicked by palmitate, a physiological substrate for *de novo* ceramide synthesis. In addition, pharmacological intervention to reduce ceramide production restored protein synthesis rate after palmitate treatment in C2C12 myotubes. The results described here point to ceramide as a novel regulator of protein synthesis in C2C12 cells. The rate of protein synthesis is governed by a number of cellular controls, including signaling by the mTOR and eIF2 pathways (Kennedy & Kaeblerlein, 2009; Kapahi *et al.*, 2010; Kaeblerlein & Kennedy, 2011). At variance with *in vitro* observations (Deldicque *et al.*, 2010), but in line with *in vivo* data (Khamzina *et al.*, 2005), the activity of the mTOR pathway, on which insulin and amino acid availability exert a positive influence, was unaffected in the present study. However, ceramide reduced both protein synthesis and signaling by the eIF2 α pathway, that is, upregulated eIF2 α phosphorylation state, in C2C12 myotubes. More interestingly, the same inhibition of muscle protein synthesis rate, together with enhanced eIF2 α phosphorylation state, was observed in DIO old rats. We therefore claim a causal link between muscle ceramide accumulation, eIF2 α hyperphosphorylation and the reduced rate of muscle protein synthesis induced by high-fat intake in old rats. eIF2 α is phosphorylated in response to environmental stresses to alleviate cell injury. It is well known that the phosphorylation of the α subunit of eIF2 reduces global translation, allowing cells to conserve resources and initiate a reconfiguration of gene expression to effectively manage stress conditions (Wek *et al.*, 2006). Accompanying this general protein synthesis control, eIF2 α phosphorylation induces translation of selected mRNAs, such as those encoding for transcription factors, for example, CHOP, that assist the regulation of genes involved in metabolism. Interestingly, the transcript level of the CHOP gene was increased here, bringing additional evidence for the participation of this specific pathway in the effect of ceramide on the rate of cellular protein synthesis in old DIO rats.

Several studies (Anderson *et al.*, 2008b; Sitnick *et al.*, 2009) have demonstrated that postprandial activation of muscle protein synthesis and load-induced skeletal muscle hypertrophy are impaired in high-fat-fed animals. The present study demonstrates that muscle protein synthesis becomes less sensitive to nutritional state in old high-fat-fed rats. Taken together, these previous data and the present study highlight that DIO in rodents appears to alter normal protein dynamics in anabolic conditions, that is, food intake and muscle loading, and during aging. As shown here, this effect seems to be explained by a decrease in the activation of Akt pathway likely associated with muscle lipid infiltration. As a consequence, a high-fat diet could accelerate the effect of aging on muscle mass and function, as well as impede recovery from injuries.

Our study bears certain limitations. First, the data for immunohistochemistry are only descriptive. It would have been interesting to quantify the histological observations by measuring the number of activated macrophages and the optical density of areas positive for fibrosis. However, the adipose tissue sections observed in this study were reproducible with a systematic increase in macrophage infiltration and areas of fibrosis in old rats fed a high-fat diet. Second, several environmental factors may differ between young and old rats and normal diet and high-fat diet rats, such as the level of physical activity. Physical activity might probably differ between the young and old animals and between the DIO and control groups due to heavier body weight of the DIO animals. The individual physical activity of the animals should be taken into account in further studies as a possible confounder (Bollheimer *et al.*, 2012). Third, it would have been informative to evaluate the potential interest of nutritional strategies able to counteract muscle lipotoxicity in old DIO rats, for example, short-term caloric restriction, to maintain or improve muscle protein anabolism. Fourth, this study is an exploratory study conducted in rodents. Little evidence in the literature suggests that the same phenomena occur in older Humans and explain the appearance of sarcopenic obesity. Clinical studies are needed to assess the potential involvement of adipogenic capacities and muscle lipotoxicity in the pathogenesis of sarcopenic obesity in Humans.

In conclusion, like Humans, rats exhibit ectopic fat deposition with aging, in particular when the DIO model is used. Therefore, the old high-fat-fed rat proved to be feasible for an experimental study of sarcopenic obesity and provided explicit pathogenic connecting points. The decreased ability of adipose tissue to store lipids contributes to the accumulation of intramuscular lipids, which place a lipid burden on mitochondria and may create a disconnect between metabolic and regulating pathways in skeletal muscles of old rats. Although the precise connection between mitochondrial activity and insulin resistance is still debated, our data demonstrate that the increased accumulation of lipid metabolism by-products is linked to impaired insulin action in palmitate-treated C2C12 myotubes and in old rats fed a high-fat diet. Additionally, the present study reveals that intramuscular lipid deposition in old DIO rats, together with palmitate-mediated lipid accumulation in C2C12 cells, affects protein synthesis rate via eIF2 α phosphorylation. The use of pharmacological inhibitors of ceramide production or the use of ceramide confirms these effects, showing that the harmful action of reactive lipids on muscle protein synthesis during aging is probably driven by ceramide accumulation inside muscle cells. Therefore, a decrease in the ability of adipose tissue to respond to DIO with age could adversely affect protein metabolism in skeletal muscle due to the toxicity of lipid species and thereby accelerate the effects of aging, that is, sarcopenia. This process may contribute to the loss of muscle function observed in sarcopenic obese patients.

Experimental procedures

Experimental design

The animal facilities and protocol were approved by the local animal ethical committee. Male Wistar rats aged 5 months (young) and 25 months (old) were purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France).

After 1-week acclimatization with a standard diet, the rats were randomly divided into four groups as follows: young rats fed a standard diet (YC, $n = 8$), young rats fed a high-energy high-fat diet (YHF, $n = 8$), old rats fed a standard diet (OC, $n = 8$), and old rats fed a high-energy high-fat diet (OHF, $n = 8$). Additional rats were used to study the postprandial effect of high-fat diet on muscle protein synthesis rate.

Experimental diet composition is given as Table S1 (Supporting information). At the end of the 10 weeks of diet, the rats were anesthetized and killed by a heart blood puncture. The muscles (soleus, tibialis anterior, plantaris, gastrocnemius, extensor digitorum longus, quadriceps) and adipose tissues were removed, weighed, and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Muscle cell culture

Differentiated C2C12 myotubes were cultured for 16 h with palmitic acid (0.375 mM) and oleic acid (0.375 mM) in the presence or absence of fumonisin B1 (FB1), a specific inhibitor of ceramide synthase. To study the specific effect of ceramides, myotubes were incubated in the presence of short-chain ceramides (C2-ceramides, 100 μM , 30 min). Aliquots of cell lysates were saved to isolate protein content in each sample. Protein synthesis rate was evaluated as described below.

Analysis

Measurement of *in vivo* and *in vitro* protein synthesis rates

A 50-mg piece of tibialis anterior or C2C12 cell proteins was used for the isolation of total protein fraction, myosin, actin, and mitochondrial proteins as previously described (Zangarelli *et al.*, 2004, 2006). Isotopic enrichment in proteins was measured by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (μGas System, Fisons Instruments, VG Isotech, Middlewich, UK). Isotopic enrichments in tissue fluid were assessed using gas chromatography-mass spectrometry (Hewlett-Packard 5971A; Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) and were used as precursor pool enrichment for the calculations of the fractional synthesis rates (FSR).

FSR of proteins were calculated using the equation:

$$\text{FSR} = (E_i \times 100) / (E_p \times t),$$

where E_i is the enrichment as atom percentage excess of tracer from proteins at time t (minus basal enrichment), E_p is the mean enrichment in the precursor pool (tissue fluid), and t is the incorporation time in hours. Data are expressed as %/day for *in vivo* experiments and as %/hour for *in vitro* experiments.

Intraperitoneal glucose tolerance test

Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed 2 weeks before slaughtering and 12 h after food withdrawal. Glucose solution was injected into the peritoneal cavity (1 g glucose/kg body weight). Blood samples were collected before glucose administration and 15, 30, 60, and 120 min later. Blood glucose concentration was measured using a glucometer (coefficient of variation of the assay: 5%; OneTouch Glucotouch, LifeScan, Milpitas, CA, USA). Serum insulin levels were measured with an Elisa kit (CV: 2%; Rat/Mouse Insulin Elisa, Linco Research, St. Charles, MO, USA). Insulin sensitivity was estimated by the product of the area under the curve (AUC) of the glucose and the AUC of insulin.

Biochemical and hormonal assay in blood and tissues

Fasting plasma concentrations of total cholesterol (CV: 3%), triglycerides (CV: 4%), and FFA (CV: 4%) were measured on an automated analyzer (Konelab 20; Thermo Electron, Waltham, MA). Fasting plasma concentrations of sTNF-R1 (CV: 5%), sTNF-R2 (CV: 4%), leptin (CV: 5%), and adiponectin (CV: 5%) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, BioCat, Heidelberg, Germany).

Western blot analysis

Denaturated proteins (50 μg) from tibialis anterior or C2C12 myotubes were separated by SDS-PAGE on a 10% or a 4–12% gradient polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene membrane (Millipore). Immunoblots were probed with primary antibodies: anti-phospho protein kinase B (Akt, Ser473), antitotal Akt, antiphospho mTOR (Ser2448), antitotal mTOR, antiphospho S6 kinase (S6k, Thr389) and antitotal S6k, antiphospho eukaryotic initiation factor 4-binding protein 1 (4E-BP1, Ser65), antitotal 4E-BP1, antiphospho eukaryotic initiation factor 2- α (eIF2- α , Ser51), antitotal eIF2- α , antiphospho eukaryotic initiation factor 2b- ϵ (eIF2b- ϵ Ser9), and antitotal eIF2b- ϵ . All the antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme distributor, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), except for anti-phospho eIF2b- ϵ (Genetex, Emmedex distributor, Mundolsheim, France). Immunoblots were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (DAKO, Trappes, France). The immune reactive strips were visualized by chemoluminescence (ECL Western Blotting Substrate, Pierce, USA). Luminescent visualization of the secondary antibodies was performed using Biomax light film (Kodak Scientific, New Haven, CT, USA). The activation states were evaluated by the ratio of phosphorylated protein to total protein expression.

Real-time quantitative RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted from 50 mg of tibialis anterior, abdominal adipose tissue, or C1C12 cell lysate with 1 ml of TRIzol (TRIzol[®] Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNase probes were obtained using SuperScript II H-RNase kit (Invitrogen). Relative RNA levels were determined by analyzing the changes in SYBR green I fluorescence (Kit Fast Start DNA Master SYBR Green I, Roche, Rotkreuz, Switzerland) during PCR according to the manufacturer's instructions. The expression of GAPDH, HPRT, and Cyp A genes was amplified, and the results were used for normalization of gene expressions in adipose tissue, skeletal muscle, and C2C12 myotubes, respectively.

Intramuscular and intracellular lipid contents

Lipids were extracted from tibialis anterior or C2C12 cell lysate according to Bligh and Dyer (Bligh & Dyer, 1959) in the presence of the internal standards. Lipids were analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using a Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary column (5 m \times 0.32 mm i.d., 0.50 μm film thickness).

Immunohistochemical detection of CD68+ macrophages, fibrosis visualization, and adipocyte size measurement in abdominal adipose tissue

Immunohistochemical detection of macrophages using CD68 (Neo-marker Microm, Francheville, France) was performed with the avidin-biotin peroxidase (ABC) method. Processed slide images were acquired by a microscope-camera system at $\times 40$ magnification (Nikon, France).

Slides of abdominal adipose tissue were also stained with picrosirius red. Fibrosis analysis was performed using Alphasys platform (HISTOLAB software, Plaisir, France) at $\times 100$ magnification with constant color thresholds.

Adipose tissue samples were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde and processed for standard paraffin embedding. Sections 5 μm thick were stained as described below and examined under a Zeiss 20 Axiostar Plus microscope (Zeiss, Germany). Digital images were captured by a camera (triCCD, Sony, France). Adipocyte diameters were measured using PERFECTIMAGE Software (ClaraVision, France).

Two sections per sample were analyzed. The two sections were spaced by 25 micrometers, that is, five sections spacing. The observation was made blindly by two independent observers.

Mitochondrial enzyme activities and gene expression

Citrate synthase (CS), 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD), and the activities of complexes I to IV were assayed spectrophotometrically in the mitochondrial suspension from tibialis anterior (Zangarelli *et al.*, 2004, 2006). All measures were performed in triplicate. Enzyme activities were expressed in nmol min⁻¹ mg⁻¹ mitochondrial proteins or as activity ratios (Zangarelli *et al.*, 2004, 2006).

Abundance of selected mRNAs in muscle mitochondria was measured with the real-time quantitative PCR system as described above.

Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM. A two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test the effect of the experimental nutritional conditions and the effect of age. When a significant effect was detected, an *a posteriori* Fisher test was applied to locate pairwise differences between groups. The data were normally distributed. STATVIEW software (version 4.02; Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) was used for the statistical analyses. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Author contributions

Nicolas Tardif and Jerome Salles participated in the definition of the study design and in the analysis of the samples. Christelle Guillet helped in designing the study. Joan Tordjman analyzed inflammation and fibrosis markers in adipose tissues. Sophie Reggio analyzed inflammation and fibrosis markers in adipose tissues. Jean-François Landrier analyzed gene expression in adipose tissue. Christophe Giraudet and Véronique Patrac participated in the analyses. Justine Bertrand-Michel analyzed lipid content in skeletal muscles and C2C12 cells. Carole Migné performed the mass spectrometry analyses. Jean-Michel Chardigny participated in the definition of the study design. Yves Boirie participated in the definition of the study design. Stéphane Walrand designed the study and participated in the analysis of the samples and data and drafted the paper.

Funding

This study was funded by the French National Research Agency (ANR, LIPAGE Project).

Conflict of interest

No conflict of interest is related to this study.

References

Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, Weindrich R (2008a) Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell* **7**, 101–111.

Anderson SR, Gilge DA, Steiber AL, Previs SF (2008b) Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. *Metabolism* **57**, 347–354.

Blachnio-Zabielska A, Baranowski M, Zabielski P, Gorski J (2010) Effect of high fat diet enriched with unsaturated and diet rich in saturated fatty acids on sphingolipid metabolism in rat skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* **225**, 786–791.

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917.

Bollheimer LC, Buettner R, Pongratz G, Brunner-Ploss R, Hecht C, Banas M, Singler K, Hamer OW, Stroszczyński C, Sieber CC, Fellner C (2012) Sarcopenia in the aging high-fat fed rat: a pilot study for modeling sarcopenic obesity in rodents. *Biogerontology* **13**, 609–620.

Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 789–800.

Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA (2003) A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **278**, 10297–10303.

Consitt LA, Bell JA, Houmard JA (2009) Intramuscular lipid metabolism, insulin action, and obesity. *IUBMB Life* **61**, 47–55.

De Vogel-van den Bosch J, Hoeks J, Timmers S, Houten SM, van Dijk PJ, Boon W, Van Beurden D, Schaart G, Kersten S, Voshol PJ, Wanders RJ, Hesselink MK, Schrauwen P (2010) The effects of long- or medium-chain fat diets on glucose tolerance and myocellular content of lipid intermediates in rats. *Obesity (Silver Spring)* **19**, 792–799.

DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **76**, 149–155.

Deldicque L, Cani PD, Philp A, Raymackers JM, Meakin PJ, Ashford ML, Delzenne NM, Francaux M, Baar K (2010) The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E695–E705.

Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, Park SW, Conroy MB, Velasquez-Mieryer P, Boudreau R, Manini TM, Nevitt M, Newman AB, Goodpaster BH, Health, Aging, and Body (2009) Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**, 1579–1585.

Divoux A, Clement K (2011) Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes. Rev.* **12**, e494–e503.

Djian P, Roncari AK, Hollenberg CH (1983) Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J. Clin. Invest.* **72**, 1200–1208.

Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE (2001) Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5755–5761.

Guillet C, Delcourt I, Rance M, Giraudet C, Walrand S, Bedu M, Duche P, Boirie Y (2009) Changes in basal and insulin and amino acid response of whole body and skeletal muscle proteins in obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 3044–3050.

Henique C, Mansouri A, Fumey G, Lenoir V, Girard J, Bouillaud F, Prip-Buus C, Cohen I (2010) Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **285**, 36818–36827.

Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudek RW, Thompson RP, Pories WJ, MacDonald KG, Cline GW, Shulman GI, Dohm GL, Houmard JA (2003) Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E741–E747.

Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP, Thyfault JP, Stevens R, Dohm GL, Houmard JA, Muoio DM (2005) Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab.* **2**, 251–261.

Kaeblerlein M, Kennedy BK (2011) Hot topics in aging research: protein translation and TOR signaling, 2010. *Aging Cell* **10**, 185–190.

Kapahi P, Chen D, Rogers AN, Katewa SD, Li PW, Thomas EL, Kockel L (2010) With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab.* **11**, 453–465.

Karagiannides I, Tchkonina T, Dobson DE, Stepan CM, Cummins P, Chan G, Salvatori K, Hadzopoulou-Cladaras M, Kirkland JL (2001) Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R1772–R1780.

Karagiannides I, Kokkotou E, Tansky M, Tchkonina T, Giorgadze N, O'Brien M, Leeman SE, Kirkland JL, Pothoulakis C (2006) Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 5207–5212.

Katsanos CS, Mandarino LJ (2011) Protein metabolism in human obesity: a shift in focus from whole-body to skeletal muscle. *Obesity* **19**, 469–475.

Kennedy BK, Kaeblerlein M (2009) Hot topics in aging research: protein translation, 2009. *Aging Cell* **8**, 617–623.

Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clement K, Lacasa D (2009) Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol. Endocrinol.* **23**, 11–24.

- Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A (2005) Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* **146**, 1473–1481.
- Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE (2007) Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **117**, 2621–2637.
- Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS (2002) Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J. Appl. Physiol.* **93**, 1168–1180.
- Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS (1990) Age, anatomic site, and the replication and differentiation of adipocyte precursors. *Am. J. Physiol.* **258**, C206–C210.
- Kirkland JL, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I (2002) Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp. Gerontol.* **37**, 757–767.
- Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira Ldos R, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC (2008) Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **216**, 796–804.
- Mazzali G, Di Francesco V, Zoico E, Fantin F, Zamboni G, Benati C, Bambara V, Negri M, Bosello O, Zamboni M (2006) Interrelations between fat distribution, muscle lipid content, adipocytokines, and insulin resistance: effect of moderate weight loss in older women. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 1193–1199.
- Merrill AH Jr (2002) *De novo* sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 25843–25846.
- Miro O, Casademont J, Casals E, Perea M, Urbano-Marquez A, Rustin P, Cardellach F (2000) Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects. *Cardiovasc. Res.* **47**, 624–631.
- Pan DA, Lilloja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH (1997) Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* **46**, 983–988.
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* **300**, 1140–1142.
- Ritchie IR, Gulli RA, Stefanyk LE, Harasim E, Chabowski A, Dyck DJ (2011) Restoration of skeletal muscle leptin response does not precede the exercise-induced recovery of insulin-stimulated glucose uptake in high-fat-fed rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R492–R500.
- Ryan AS, Nicklas BJ (1999) Age-related changes in fat deposition in mid-thigh muscle in women: relationships with metabolic cardiovascular disease risk factors. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23**, 126–132.
- Salminen A, Kaarniranta K (2010) ER stress and hormetic regulation of the aging process. *Ageing Res. Rev.* **9**, 211–217.
- Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ (1999) Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J. Biol. Chem.* **274**, 24202–24210.
- Sitnick M, Bodine SC, Rutledge JC (2009) Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. *J. Physiol.* **587**, 5753–5765.
- Slawik M, Vidal-Puig AJ (2007) Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr.* **2**, 41–45.
- Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA (2010) Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E1016–E1027.
- Storz P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G (1999) Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *Eur. J. Biochem.* **266**, 17–25.
- Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scabble H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL (2010) Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* **9**, 667–684.
- Thompson AL, Lim-Fraser MY, Kraegen EW, Cooney GJ (2000) Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle *in vitro*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**, E577–E584.
- Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, Pujol C, Boutin JA, Langin D (2007) Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia* **50**, 2190–2199.
- Walrand S, Zangarelli A, Guillet C, Salles J, Soulier K, Giraudet C, Patrac V, Boirie Y (2011) Effect of fast dietary proteins on muscle protein synthesis rate and muscle strength in *ad libitum*-fed and energy-restricted old rats. *Br. J. Nutr.* **106**, 1683–1690.
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 7–11.
- Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT (2009) Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 20405–20410.
- Zangarelli A, Walrand S, Guillet C, Gachon P, Rousset P, Giraudet C, Picard B, Boirie Y (2004) Centrifugation-based isolation of myosin for measurement of its synthesis rate in small muscle samples. *Anal. Biochem.* **327**, 55–60.
- Zangarelli A, Chanseaux E, Morio B, Brugère C, Mosoni L, Rousset P, Giraudet C, Patrac V, Gachon P, Boirie Y, Walrand S (2006) Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB J.* **20**, 2439–2450.
- Zoico E, Rossi A, Di Francesco V, Sepe A, Oliosio D, Pizzini F, Fantin F, Bosello O, Cominacini L, Harris TB, Zamboni M (2010) Adipose tissue infiltration in skeletal muscle of healthy elderly men: relationships with body composition, insulin resistance, and inflammation at the systemic and tissue level. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **65**, 295–299.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Table S1. Diet composition.

Table S2. Primer sequences for the quantitative analysis of gene expression.